

MASTEROPPGAVE I LEGEMIDDELANALYSE FOR GRADEN MASTER I FARMASI

Væskefilm-mikroekstraksjon koblet til desorpsjon-elektrosprayionisering massespektrometri

*En enkel og rask metode for ekstraksjon og
analyse av legemidler i biologiske væsker*

Cecilie Rosting



Faggruppen for Legemiddelanalyse, Avdeling for
farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt, Det
matematisk-naturvitenskapelige fakultet
UNIVERSITETET I OSLO

2013

Væskefilm-mikroekstraksjon koblet til desorpsjon-elektrosprayionisering massespektrometri

En enkel og rask metode for ekstraksjon og analyse av legemidler i biologiske væsker

Cecilie Rosting

Masteroppgave ved faggruppen for Legemiddelanalyse, Avdeling for farmasøytisk kjemi,
Farmasøytisk institutt, Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet, Universitetet i Oslo.

Det praktiske arbeidet ble gjennomført ved Institut for Farmaci, Det Sundhedsvidenskabelige
Fakultet, Københavns Universitet
i perioden august 2012 til februar 2013.

Veiledere:

Professor Stig Pedersen-Bjergaard

Lektor Christian Janfelt

Professor Steen Honoré Hansen

© Cecilie Rosting

2013

Væskefilm-mikroekstraksjon koblet til desorpsjon-elektrosprayionisering massespektrometri

Cecilie Rosting

<http://www.duo.uio.no/>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

Forord

Jeg vil rette en stor takk til min hovedveileder Stig Pedersen-Bjergaard for god veiledning og tett oppfølging under arbeidet med min masteroppgave, både i København og i Oslo.

Stor takk rettes også til Christian Janfelt som har vært min veileder ved Københavns Universitet. Takk for svært god veiledning, engasjement, og oppmuntring. Takk også for bildene som du har redigert til oppgaven.

Jeg ønsker også å takke Steen Honoré Hansen for mottakelsen ved Københavns Universitet, samt for nyttige råd i forbindelse med laboratoriearbeidet. I tillegg vil jeg gjerne takke alle andre ansatte på 6. etasje ved Institut for Farmaci og Analytisk Kemi, som har hjulpet meg med store og små problemer på laboratoriet.

Semesteret i København var fantastisk og det hadde ikke vært det samme uten en god venninne. Takk til Helene for en flott tid i København!

Tilslutt vil jeg takke mine foreldre og Christian for korrekturlesing av oppgaven og for støtten gjennom studietiden.

Oslo, mai 2013

Cecilie Rosting

Innholdsfortegnelse

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | Sammendrag | 8 |
| 2 | Forkortelser | 9 |
| 3 | Introduksjon | 11 |
| 4 | Teori | 15 |
| 4.1 | Væskefase-mikroekstraksjon | 15 |
| 4.1.1 | Prinsipp for væskefase-mikroekstraksjon..... | 15 |
| 4.1.2 | Fordelingskoeffisienten..... | 16 |
| 4.1.3 | Væskemembranen..... | 16 |
| 4.1.4 | Utbytte..... | 17 |
| 4.1.5 | Oppkonsentrering..... | 17 |
| 4.1.6 | Ekstraksjonen i dette prosjektet..... | 17 |
| 4.2 | Desorpsjon-elektrosprayionisering massespektrometri..... | 18 |
| 4.2.1 | Prinsipp for desorpsjon-elektrosprayionisering massespektrometri..... | 18 |
| 4.2.2 | Overflate for analyse..... | 19 |
| 4.2.3 | Sprayløsemiddelet..... | 19 |
| 4.2.4 | Ioneundertrykking..... | 20 |
| 5 | Eksperimentelt | 21 |
| 5.1 | Vækefilm-mikroekstraksjon..... | 21 |
| 5.1.1 | Beskrivelse av ekstraksjonsenheten..... | 21 |
| 5.1.2 | Betingelser for ekstraksjonen..... | 22 |
| 5.2 | DESI-MS..... | 23 |
| 5.2.1 | Utstyr for DESI-MS..... | 23 |
| 5.2.2 | Betingelser for DESI-MS..... | 23 |
| 5.3 | Veieeksperiment..... | 24 |
| 5.4 | LC-MS..... | 24 |
| 5.5 | Karakteristikk av modellanalyttene..... | 25 |

| | | |
|-------|--|-----------|
| 5.6 | Løsninger..... | 26 |
| 5.6.1 | Stamopløsninger og standardløsninger..... | 26 |
| 5.6.2 | Biologiske prøver..... | 27 |
| 5.7 | Autentiske prøver..... | 27 |
| 5.8 | Kjemikalier..... | 27 |
| 6 | Resultater og diskusjon..... | 28 |
| 6.1 | Optimalisering av ekstraksjonen..... | 28 |
| 6.1.1 | Væskefilm for analyttene metadon, amitriptylin, nortriptylin, petidin, haloperidol og loperamid..... | 28 |
| 6.1.2 | Stabiliteten til n-heksadekan..... | 29 |
| 6.1.3 | Væskefilm for analyttene morfin, amfetamin og metamfetamin..... | 30 |
| 6.1.4 | LC-MS-analyse av analyttene morfin, amfetamin og metamfetamin i prøveløsningen..... | 32 |
| 6.1.5 | LC-MS-analyse av analyttene metadon, amitriptylin, nortriptylin, petidin, haloperidol og loperamid i prøveløsningen..... | 33 |
| 6.1.6 | Prøvevolum for analyttene metadon, amitriptylin, nortriptylin, petidin, haloperidol og loperamid..... | 35 |
| 6.2 | Optimalisering av DESI-parametere..... | 37 |
| 6.2.1 | Sprayløsemiddel for analyttene metadon, amitriptylin, nortriptylin, petidin, haloperidol og loperamid..... | 37 |
| 6.2.2 | Sprayløsemiddel for analyttene morfin, amfetamin og metamfetamin..... | 38 |
| 6.3 | Biologiske prøver..... | 39 |
| 6.4 | Analyse av <i>under-</i> og <i>oversiden</i> av væskefilmene..... | 41 |
| 6.5 | Internstandard..... | 44 |
| 6.6 | Deteksjonsgrenser..... | 45 |
| 6.7 | Standardkurver..... | 47 |
| 6.8 | Pålitelighetstest..... | 50 |
| 6.9 | Autentiske prøver..... | 51 |

| | | |
|-------|---|----|
| 6.9.1 | Deteksjon av difenhydramin i autentiske prøver..... | 51 |
| 6.9.2 | Konsentrasjon difenhydramin i autentisk urinprøve..... | 53 |
| 7 | Konklusjon | 55 |
| 8 | Litteraturliste | 56 |
| | Vedlegg | 59 |
| | Vedlegg 1: Signalintensitet for modellanalyttene med ulike sprayløsemidler. | |

1. Sammendrag

I denne oppgaven ble en ny kombinasjon for ekstraksjon av legemidler og analyse med DESI-MS demonstrert. Ekstraksjon ble utført med væskefilmer av n-heksadekan immobilisert i teflon, kalt væskefilm-mikroekstraksjon. Legemidler ble ekstrahert fra vandige og biologiske prøver, og over til denne organiske væskefilmen, etter prinsippet væskefase-mikroekstraksjon. Væskefilmene ble deretter direkte analysert med DESI-MS, uten at disse måtte tørke før analysen. Denne kombinasjonen mellom prøveopparbeidelse og analyse ga mulighet for rask deteksjon og kvantifisering av legemidler i biologiske prøver.

De seks basiske legemidlene metadon, amitriptylin, nortriptylin, petidin, loperamid og haloperidol ble valgt som modellanalytter. MeOH 1 % HCOOH ble valgt som løsemiddel for sprayen, prøvevolum ble satt til 150 µl og ekstraksjonstiden ble satt til 10 minutter. Dette ga utbytte med mellom 22-91 % og modellanalyttene ble oppkonsentrert fra 22 til 91 ganger.

Metoden ble også testet på fire stoffer med lavere log p-verdi enn modellanalyttene: Morfin, amfetamin, metamfetamin og kokain. For morfin, amfetamin og metamfetamin var signalintensitet fraværende eller så lave at ekstraherte ionekronogram ikke kunne benyttes til kvantitative målinger. LC-MS-analyse av prøveløsningen viste at morfin ikke ble ekstrahert over til væskefilmene, mens 20-30 % av mengden amfetamin og metamfetamin i prøveløsningen ble ekstrahert over til n-heksadekan. Andre sprayløsemidler og væskefilmer ble forsøkt uten at dette løste problemet med lave signalintensiteter fra disse stoffene.

Metoden var kompatibel med de biologiske matriksene urin, spytt og helblod. Ved å analysere fra *undersiden* av væskefilmene (som ikke hadde vært i kontakt med prøveløsningene) ble ioneundertrykking redusert. For analyttene metadon, amitriptylin, nortriptylin og petidin ble deteksjonsgrenser ($S/N=5$) mellom 4ng/ml til 17ng/ml fastsatt. Prøver ($n=20$) med ulike konsentrasjoner av analyttene bekreftet at deteksjonsgrensene var pålitelige. For disse fire analyttene ble også lineære standardkurver (R^2 -verdier $\geq 0,989$) i området 25-300 ng/ml tillaget. Standardkurvene ble benyttet som kalibreringskurver i en pålitelighetstest. I denne testen ble konsentrasjoner ($n=8$) bestemt med avvik mellom -6 og -30 % fra tilsatt konsentrasjon. Legemiddelet difenhydramin kunne også påvises i autentiske blod-, spytt- og urinprøver fra en frisk frivillig etter inntak av to tabletter *Tylenol PM*.

2. Forkortelser

| | |
|-------|--|
| µg | Mikrogram |
| µl | Mikroliter |
| ACN | Acetonitrill |
| CE | Capillary electrophoresis (kapillærelektroforese) |
| cm | centimeter |
| DESI | Desorption electrospray ionization (Desorpsjon-elektrosprayionisering) |
| EIC | Extracted ion chromatogram (Ekstraherte ionechromatogram) |
| ESI | Elektrosprayionisering |
| FDA | U.S Food and Drug Administrations |
| GC | Gas chromatography (gasskromatografi) |
| HCOOH | Maursyre |
| HPLC | High performance liquid chromatography (væskekromatografi) |
| IS | Internstandard |
| kg | Kilogram |
| kV | Kilovolt |
| L | Liter |
| LC | Liquid chromatography (Væskekromatografi) |
| LLE | Liquid-liquid extraction (Væske-væske-ekstraksjon) |
| LPME | Liquid- phase microextraction (Væskefase-mikroekstraksjon) |
| M | Mol/liter |
| min | minutt |
| mg | milligram |
| mM | Millimol/liter |
| mm | Millimeter |
| mm/s | Millimeter per sekund |

| | |
|-----------------|--|
| MS | Massespektrometri |
| m/z | Masse over ladning |
| NaCl | Natrium chloride (natriumklorid) |
| NaOH | Natriumhydroksid |
| ng | Nanogram |
| NH ₃ | Ammoniakk |
| R ² | Korrelasjonskoeffisient |
| rpm | revolutions per minute (omdreininger per minutt) |
| RSD | Relativt standardavvik |
| S/N | Signal to noise (signal-til-støy forholdet) |
| SPE | Solid-phase extraction (Fast-fase-ekstraksjon) |

3. Introduksjon

Kjemisk analyse er et verktøy som benyttes til å kontrollere legemidler eller misbruksstoffer i biologiske matrikser. Eksempler på biologiske matrikser er urin, blod, spytt og plasma. Denne type analyse kalles bioanalyse [1]. Miljøvennlige og raske analyser som gir god presisjon og nøyaktighet er av stor interesse. Hvordan prøven behandles før analysen og hvilket utstyr som benyttes til analysen vil være viktig for å imøtekomme disse kriteriene.

Prøveopparbeidelse er en sentral del av analysearbeidet fordi prøver ofte inneholder andre komponenter enn den eller de som er interessante [2]. Biologiske prøver som urin, plasma eller spytt inneholder mange slike såkalte matrikskomponenter. Disse kan ødelegge analyseinstrumentet eller påvirke analyttens signal. Ved å utføre en prøveopparbeidelse før analysen vil problemene knyttet til matrikskomponentene minimeres. Prøveopparbeidelse kan også gi oppkonsentrering av analytten. Dette er en fordel fordi konsentrasjonene av stoffer i biologiske prøver ofte er lave. De mest utbredte teknikkene for prøveopparbeidelse er væske-væske-ekstraksjon (LLE) og fast-fase-ekstraksjon (SPE).

LLE er en metode som utnytter analyttens fordeling mellom en organisk fase og en vandig fase [3]. Fordelingen mellom de to fasene er blant annet bestemt av det organiske løsemiddelet og lipofilisiteten til analytten. Volumforholdet mellom de to fasene, pH i den vandige fasen og ekstraksjonstiden er andre viktige parametere i LLE.

I SPE vil analytten retarderes i en kolonne ved at denne interagerer med kjemiske grupper på en fast fase i kolonnen [4]. Andre matrikskomponenter vaskes ut av systemet fordi disse ikke vil interagere med denne fasen. Slik vil analyttene isoleres fra matrikskomponentene. Etter fjerning av uønskede komponenter fra prøven, elueres analytten ut med et løsemiddel som bryter interaksjonene mellom analytten og den faste fasen.

Omfattende bruk av organiske løsemidler, tidsforbruk og automatiseringsproblemer er noen av ulempene forbundet med LLE og SPE. Nye metoder å utføre prøveopparbeidelse på er derfor av interesse. Mikroekstraksjoner er en relativt ny metode innenfor prøveopparbeidelse og kan løse problemene knyttet til LLE og SPE [5].

Væskefase-mikroekstraksjon (LPME) kan sammenliknes med en miniaturisert LLE. En av de første publiserte metodene var basert på en dråpe organisk løsemiddel hengende fra en sprøytekanyle [6]. Denne dråpen ble plassert i en vandig prøve som inneholdt analytten.

Analytten ble ekstrahert fra prøven og over til dråpen via passiv diffusjon. Dråpen ble deretter trukket inn i sprøyten og benyttet videre til analyse. Denne metoden ga mulighet for høy oppkonsentrering av analytten og minimerte forbruket av organiske løsemidler. En av ulempene med dette systemet var mangel på robusthet siden dråpen lett kunne gå tapt.

LPME med hul polypropylenfiber har vist seg å være et mer robust format for prøveopparbeidelse. Dette LPME-systemet ble for første gang beskrevet i 1999 av Pedersen-Bjergaard og Rasmussen [7]. En organisk fase immobiliseres i hulfiberen og fungerer som en væskemembran. Hulfiberen plasseres så i prøveløsningen, også kalt donorfasen. LPME kan utføres i et tofasesystem eller i et trefasesystem. I et tofasesystem vil analytten(e) ekstraheres fra donorfasen og over til et organisk mikroekstrakt inni hulfiberen, også kalt akseptorfasen. I trefase LPME vil denne akseptorfasen være en vandig løsning.

Ekstraksjonen er basert på passiv diffusjon av legemidlene og fordelingskoeffisienten til analyttene er viktig for ekstraksjonen [8]. Justering av pH vil være essensielt for analytter som inneholder basiske eller sure funksjonelle grupper. Hydrofile analytter vil ofte ha dårlig fordeling over til den organiske fasen. For å bedre ekstraksjonen av disse stoffene kan en bærer tilsettes donorfasen eller den organiske membranen. Denne danner et kompleks med analytten [9]. Det totale molekylet vil da være mer hydrofobt, og i større grad ekstraheres over til akseptorfasen.

LPME gir rene ekstrakter som er kompatible med analysesystemer og legemidler med ulike kjemiske egenskaper kan ekstraheres med denne metoden [9-11]. LPME har også blitt utført på en rekke biologiske prøver og analytter har vist seg å kunne ekstraheres med LPME fra matrikser som helblod, plasma, urin, spytt og brystmelk [12-15].

Ekstraksjonen er kontrollert av parametere som prøvevolum, volum av akseptorfasen, fordelingskoeffisient, viskositeten til prøven, tykkelse av væskelaget på grensen mellom donorfasen og væskemembranen og overflatearealet til væskemembranen [16]. Den største ulempen med LPME er ekstraksjonstiden. Optimal ekstraksjonstid kan være mellom 15-45 minutter, avhengig av analytten. Elektromembranekstraksjon (EME) ble introdusert i 2006 [17]. Denne type ekstraksjon gjøres ved at ekstraksjonsenheten påsettes spenning og en elektrisk potensialforskjell vil være drivkraften i ekstraksjonen. Dette har vist seg å gi ekstraksjoner som er 6-17 ganger raskere enn ved ekstraksjon med LPME [18].

Massespektrometer, benyttes som instrument i massespektrometri (MS), og er en detektor i analytisk sammenheng. Denne detektoren gir god sensitivitet og høy spesifisitet, og er en viktig detektor i analyse [19]. Prinsippet til et massespektrometer er å ionisere stoffer for deretter å analysere disse etter deres forhold mellom masse og ladning (m/z).

For å kunne måle analytten i MS må denne ioniseres før den kommer inn i detektoren. Det er flere måter og ionisere analytten på. Eksempler på ioniseringsteknikker er elektronionisering, kjemisk ionisering og elektrosprayionisering. Elektrosprayionisering (ESI) kombinert med væskechromatografi er i dag den mest utbredte ioniseringsteknikken i MS-analyser [20]. I ESI er analytten løst i en flyktig væske og ioniseringen foregår under atmosfærisk trykk.

Nitrogengass fører til at det dannes en aerosol av væsken og spenning fører til at disse aerosoldråpene får ladning. Væsken fordampes før inngangen til selve masseanalysatoren slik at det tilslutt bare er ioner igjen. Disse vil ved hjelp av elektrisk spenning bevege seg inn til masseanalysatoren.

Det har etter hvert blitt større interesse for andre ioniseringsteknikker. Mange av de relativt nye teknikkene omfatter ionisering av analyttene i omgivelsen utenfor selve massespektrometeret. Desorpsjon-elektrosprayionisering (DESI) ble først beskrevet i 2004 og er et eksempel på en av disse ioniseringsteknikkene [21]. Denne metoden kombinerer ESI med desorpsjon.

DESI-MS er en analysemetode der prøven som skal analyseres ikke må føres inn i selve instrumentet. I motsetning til ESI vil ikke analytten foreligge i sprayløsningen, men på overflaten som sprayen rettes mot. Væsker, som for eksempel urin, kan avsettes på en overflate og denne vil deretter analyseres for innholdsstoffer med DESI-MS [22]. Analyse med DESI-MS kan også utføres direkte på overflater, som for eksempel deteksjon av eksplosiva fra glass, papir og plastikk [23]. Dette gir mulighet for raske analyser av prøver. DESI-MS har et bredt bruksområde. Eksempler på bruksområder er bioanalyse, analyse av næringsmidler og overvåking av offentlig sikkerhet [24].

Biologiske prøver er komplekse matrikser, og analyseresultatet kan bli påvirket av andre forbindelser i matriksen [25]. Analyse med DESI-MS gir mindre behov for prøveopparbeidelse da selve prøven ikke skal inn i MS-instrumentet. Likevel har det vist seg at matrikskomponenter i prøven kan gi problemer [26]. DESI-MS har tidligere blitt kombinert

med LLE og SPE [27], med fastfase-mikroekstraksjon [28, 29], med tynnfilm-mikroekstraksjon [30] og med LPME [31].

I tidligere publisert litteratur ble 3-fase LPME utført med polypropylen til immobilisering av væskemembranen. Akseptorfasen ble deretter deponert på teflon for videre analyse med DESI-MS [31]. Med denne metoden måtte akseptorfasen tørke inn på teflonen før analysen. Dette økte den totale analysetiden med cirka 30 minutter. Analyttene hadde også ulike tørkemønstre og selve tørkemønsteret viste seg å være viktig ved valg av internstandard.

I denne masteroppgaven beskrives en ny metode for ekstraksjon av legemidler kombinert med DESI-MS. Metoden er en videreutvikling av den tidligere publiserte metoden med LPME og DESI-MS [31]. I dette prosjektet ble organisk løsemiddel immobilisert i teflon. Analyttene ble ekstrahert fra prøveløsningen og over til denne organiske fasen, også kalt væskefilm-mikroekstraksjon. De organiske væskefilmene ble etter ekstraksjonen direkte analysert med DESI-MS, uten at disse måtte tørke først. Dette ga færre trinn i prøveopparbeidelsen, og problemer knyttet til tørketid og tørkemønstre ble unngått.

Hovedfokuset for oppgaven var å:

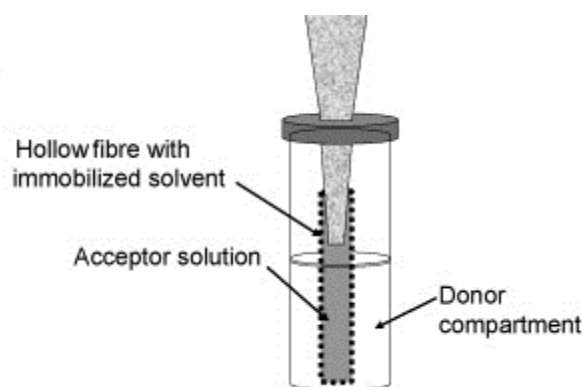
- Ekstrahere analytter over til organiske væskefilmer immobilisert i teflon.
- Detektere analyttene direkte fra disse væskefilmene med DESI-MS.
- Optimalisere DESI-parametere og ekstraksjonsparametere.
- Undersøke metodens kompatibilitet med biologiske væsker.
- Vurdere muligheten for å benytte metoden til kvantitative analyser.

4. Teori

4.1 Væskefase-mikroekstraksjon

4.1.1 Prinsipp for væskefase-mikroekstraksjon

LPME består av en organisk fase som via kapillære krefter immobiliseres i en hulfiber [32]. Denne hulfiberen er som regel porøs polypropylen med en tykkelse på 200 µm og porestørrelse på 0,2 µm. Et enkelt oppsett som er beskrevet i en rekke publiserte artikler er vist i figur 1. I dette oppsettet festes hulfiberen til en pipettespiss og plasseres i en vial der det er plass til prøven (donorfasen).



Figur 1: Oppsettet for væskefase-mikroekstraksjon. Figuren er hentet fra referanse [18].

Ekstraksjonen kan utføres i et 2-fasesystem eller et 3-fasesystem. I 2-fase LPME vil hulfiberen, etter immobilisering av væskemembranen, fylles med den samme organiske løsningen (akseptorfasen) som benyttes til væskemembranen. Ligning 1 beskriver hvordan analytten fordeler seg mellom de to fasene [33]. Akseptorløsningen fra en 2-faseekstraksjon kan analyseres direkte med GC [14].

$$A_{\text{donorfase}} \leftrightarrow A_{\text{organisk akseptorfase}}$$

Ligning 1

I et 3-fasesystem vil hulfiberen fylles med en vandig akseptorløsning. Ligning 2 beskriver hvordan analytten fordeler seg mellom de tre fasene i dette systemet [33]. Den vandige akseptorfasen kan etter ekstraksjonen analyseres med CE eller med HPLC.

$$A_{\text{donorfase}} \leftrightarrow A_{\text{organiskmembran}} \leftrightarrow A_{\text{vandig akseptorfase}} \quad \text{Ligning 2}$$

Siden den organiske fasen er immobilisert i hulfiberen vil ikke denne diffundere ut til donorfasen eller akseptorfase. Ekstraksjonssystemet kan dermed rystes under ekstraksjonen. Det stillestående væskelaget ved væskemembranene vil reduseres ved rysting [18]. Rysting vil også øke konveksjonen i prøven. Dette vil øke ekstraksjonshastigheten.

4.1.2 Fordelingskoeffisienten

Drivkraften i ekstraksjonen er passiv diffusjon av analyttene mellom fasene [8]. Analyttens grad av fordeling mellom en vandig fase og en organisk fase er beskrevet av fordelingskoeffisienten vist i ligning 3.

$$K = [A]_{\text{organiskfase}} / [A]_{\text{donorfase}} \quad \text{Ligning 3}$$

Fordelingskoeffisienten K uttrykker analyttkonsentrasjonen $[A]$ ved likevekt i henholdsvis organisk akseptorfase og i donorfase. Ligningen viser at en høy fordelingskoeffisient er fordelaktig hvis analytten effektivt skal transporteres fra den vandige fasen og over til den organiske fasen.

For substanser med ioniserbare grupper er det viktig at pH i donorfase justeres slik at fordelingskoeffisienten er høy. For basiske stoffer vil høy pH være fordelaktig fordi høy pH undertrykker ionisering av basiske grupper. Dette vil nedsette analyttens løselighet i den vandige fasen (donorfase). For sure stoffer vil det være fordelaktig med en lav pH fordi lav pH vil undertrykke ionisering av sure grupper.

Kun stoffer med tilstrekkelige lipofile egenskaper kan passere væskemembranen. LPME gir derfor rene ekstrakter som er kompatible med GC, HPLC og CE [14].

4.1.3 Væskemembranen

Den organiske fasen som utgjør væskemembranen i LPME må tilfredsstille en rekke krav. Denne må være uløselig i vann og løseligheten til analyttene bør være høyere i denne fasen enn i donorfase [11]. Den organiske fasen må også kunne immobiliseres i porene til

hulfiberen og bør være så lite flyktig som mulig slik at den ikke fordamper under ekstraksjonen.

4.1.4 Utbytte

I en prøveopparbeidelse risikerer man alltid at noe av analytten går tapt. Utbyttet (R) skal derfor alltid bestemmes for nye ekstraksjonsmetoder [2]. Utbyttet påvirkes blant annet av fordelingskoeffisienten til analytten, valg av organisk fase og ekstraksjonstid [7, 33]. Ekstraksjonen utføres ofte til likevekten av analytten mellom fasene er innstilt. Ved denne ekstraksjonstiden er utbytte for den gjeldende analytten maksimal. Utbyttet angis i prosent og formelen er vist i ligning 4.

$$R = (W_e/W_p) \times 100 \% \quad \text{Ligning 4}$$

W_e er mengde analytt i ekstraktet og W_p er mengde analytt i den opprinnelige prøven.

4.1.5 Oppkonsentrering

I LPME er det fordelaktig med et høyt volumforhold mellom donorfase og akseptorfase [7]. Dette gir mulighet for oppkonsentrering (E) av analytten. Typisk volum akseptorfase er 15-25 μ l, mens typisk volum donorfase er 0,5-4 ml [11-14]. Prøvevolum over 1 L kombinert med akseptorfasevolum på 20 μ l har også vært benyttet [34]. Ved 100 % utbytte gir dette oppkonsentrering med en faktor 50 000. Oppkonsentrering kan være en fordel spesielt der konsentrasjonen av analytt i den opprinnelige prøven er lav. Oppkonsentrering beregnes av følgende formel og angis uten benevnning [2]:

$$E = C_e/C_p \quad \text{Ligning 5}$$

C_e er konsentrasjonen i akseptorfase, mens C_p er den opprinnelige konsentrasjonen i donorfase.

4.1.6 Ekstraksjonen i dette prosjektet

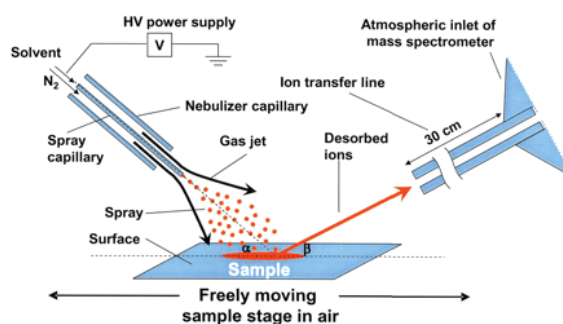
I dette prosjektet ble ekstraksjonene ikke utført i vialer med hulfiber, men med organiske væsker immobilisert i porøs teflon. Den organiske væsken fungerte ikke som en membran

analyttene skulle ekstraheres igjennom. Disse væskene var derimot den endelige fasen analyttene skulle foreligge i. Teflonen som ble benyttet til immobilisering av den organiske fasen hadde flat geometri og relativ lav tykkelse. Dette førte til at den organiske fasen lå som et tynt lag, eller en film, i teflonen. Ekstraksjonsmetoden i dette prosjektet har derfor fått betegnelsen væskefilm-mikroekstraksjon. Oppsettet og betingelser for ekstraksjonen er nærmere beskrevet i avsnitt 5.1. Teorien rundt 2-fase LPME, som er beskrevet i avsnittene over, gjelder også for væskefilm-mikroekstraksjon.

4.2 Desorpsjon-elektrosprayionisering massespektrometri

4.2.1 Prinsipp for desorpsjon-elektrosprayionisering massespektrometri

DESI er en ioniseringsteknikk for massespektrometri. Ionisering av stoffer som skal analyseres vil i denne teknikken foregå utenfor massespektrometeret, under atmosfærisk trykk [35]. En løsning, tilført spenning, pumpes via en sprøytepumpe gjennom et kapillær og mot overflaten som skal analyseres [36]. Ved utgangen av kapillæret vil et ytre kapillær, som omslutter det indre væske-kapillæret, tilføre nitrogengass til væsken. Dette fører til at det dannes en aerosol av væsken og væsken kommer ut som ladede dråper. Denne aerosolen rettes mot overflaten med vinkel α og med en bestemt avstand. I motsetning til ESI vil ikke sprayløsningen inneholde stoffene vi ønsker å analysere. Disse stoffene befinner seg på overflaten som aerosolen rettes mot. Figur 2 illustrerer prinsippet for DESI-MS.



Figur 2: Prinsippet for DESI-MS. Figuren er hentet fra referanse [21].

Det eksisterer flere teorier som beskriver ioniseringsprosessen i DESI. Den mest omtalte mekanismen er ”droplet-pick-up”-mekanismen [37, 38]. Dråpene fra elektrosprayen har vanligvis en diameter på under 10 μm . Hastigheten til disse er over 100 m/s når de treffer overflaten som skal analyseres. Sprayløsningen vil først fukte overflaten slik at det dannes en film av sprayløsningen på denne overflaten. Analytten(e) vil bevege seg (desorbere) fra overflaten og til denne filmen. Sekundære dråper fra sprayen vil så bryte opp filmlaget. Dette fører til dannelsen av dråper som beveger seg ut fra filmlaget og mot inngangen til massespektrometeret. Et MS-inngangskapillær skal minimere avstanden mellom åpningen inn til massespektrometeret og prøvetakingsområdet. Fordampning og stadig eksplosjon av dråpene til mindre dråper, gjør at disse dråpene blir igjen som ioner før de når inn til selve masseanalysatoren [36].

4.2.2 Overflate for analyse

Analysekvaliteten kan bli påvirket av overflaten som analytten(e) skal analyseres fra. Grove overflater minker sannsynligheten for at sprayløsemiddelet sprutes til andre deler av overflaten og vasker bort analyttene som eventuelt befinner seg der [39, 40]. I tillegg bør interaksjoner mellom overflaten og analytten være minimal slik at analyttene blir desorbert. Porøs teflon har vist seg å ha egenskaper som tilfredsstiller disse kravene. Dette materialet har en relativ grov overflate og har generelt lav affinitet til mange analytter. Siden stoffene analyseres etter deres m/z -verdi, er det essensielt at analyttene er ladet når de kommer inn i MS-analysatoren. Overflaten må av den grunn ikke nøytralisere ladningen på dråpene fra sprayen eller dråpene som ligger på overflaten [24].

4.2.3 Spraysløsemiddelet

Sprayløsemiddelet har vist seg å være en viktig parameter i DESI-MS. Valg av sprayløsemiddel bør gjøres på bakgrunn av analyttens egenskaper [41]. Polare analytter vil i større grad desorberes fra overflaten og til væskefilmen ved bruk av polare løsemidler i sprayen. Upolare analytter desorberer derimot bedre når upolare løsemidler benyttes. Bruk av syre i sprayløsningen kan være en fordel ved analyse i positiv ionemodus da dette fremmer

protonering av baser. Likeledes vil tilsetning av en base i sprayløsningen være fordelaktig ved analyse i negativ ionemodus.

4.2.4 Ioneundertrykking

Ioneundertrykking er ofte assosiert med ioniseringsteknikken ESI, og som tidligere nevnt kan DESI på mange måter sammenliknes med ESI. Ioneundertrykkings-effekter fra matriksen kan føre til at analyttens signalintensitet i massespekteret blir lavere [40]. Dette vil øke deteksjonsgrensen til analytten. I tillegg kan ioneundertrykking gi betydelige feil ved kvantitative analyser.

Ioneundertrykking i ESI kan forklares gjennom flere mekanismer. Innhold av ikke-flyktige substanser vil kunne føre til at dannelse og fordampning av dråper blir mindre effektiv [42]. Dette vil redusere mengden ioner som når fram til masseanalysatoren. En substans som danner et ionepar med analyttene, vil også kunne endre analyttenes ionisering [25]. Dette vil kunne føre til at signalintensiteten fra analytten blir lavere. Molekyler som befinner seg på dråpens overflate har større sannsynlighet for å bli ionisert. Dersom andre substanser enn analytten befinner seg på overflaten til dråpene, vil mengde analytt som ioniseres bli redusert.

Ved analyse av flere prøver der analyseresultatene skal sammenliknes, vil ioneundertrykking være et problem hvis den ikke er konstant. Bruk av internstandard kan løse dette problemet hvis den påvirkes av ioneundertrykking i like stor grad som analytten.

5. EKSPERIMENTELT

5.1 Væskefilm-mikroekstraksjon

5.1.1 Beskrivelse av ekstraksjonsenheten

Ekstraksjonen ble utført i en aluminiumsenhet (8,90 cm × 2,70 cm) bestående av fire deler, produsert ved Institut for Farmaci (Universitetet i København, København, Danmark). Et bilde av enheten og en prinsippskisse er vist i henholdsvis figur 3 og 4. De fire delene kan festes sammen ved hjelp av skruer. Et stykke teflon plasseres på bunnplaten og festes med en ramme for å lette deponeringen av den organiske fasen. Bunnplaten har også hull som synes gjennom teflonen. Dette gjør det lettere å se hvor den organiske fasen skal deponeres for at disse skal passe til brønnene. I aluminiumsrammen plasseres brønnene som er boret ut i plast. Denne plastdelen består av åtte brønner. Dette gir mulighet for å utføre åtte ekstraksjoner samtidig. De sylindriske brønnene er åpne i begge ender og har en diameter på 6 mm og en høyde på 9 mm. Brønnene plasseres rett over de organiske væskefilmene og skrues deretter fast til bunnplaten av ekstraksjonsutstyret. Over brønnene plasseres et lokk som skrues fast til de tre andre delene. Dette lokket gjør at ekstraksjonsenheten blir tett slik at hele enheten kan ristes under ekstraksjonen.



Figur 3: Bilde av ekstraksjonsenheten.

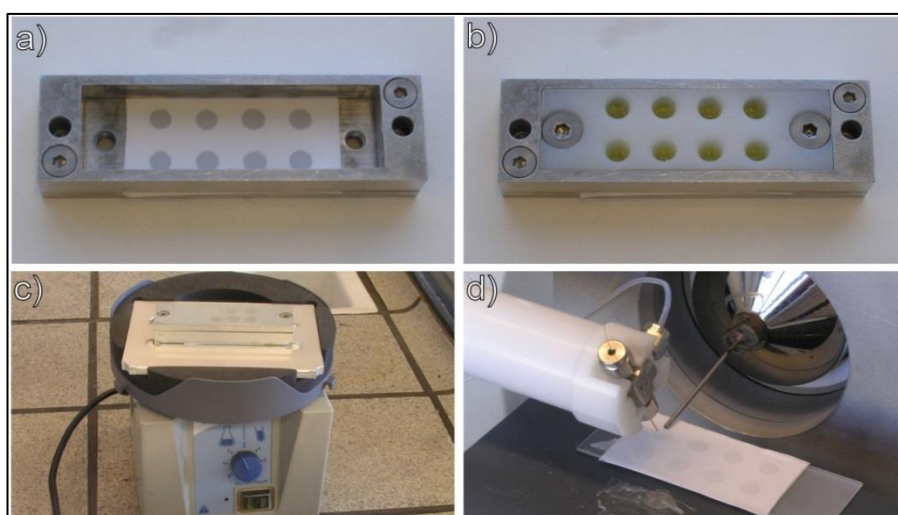


Figur 4: Prinsippskisse av ekstraksjonsenheten.

5.1.2 Betingelser for ekstraksjonen

Porøs teflon ble levert av Berghof (Eningen, Tyskland) og ble benyttet til å immobilisere de organiske væskefilmene i. Teflonen hadde en porestørrelse på 7 μm , porevolum på 36 % og en tykkelse på 0,2 mm. Et stykke teflon (3 cm \times 5 cm) ble plassert på den nederste delen av ekstraksjonsutstyret, som beskrevet i forrige avsnittet. Åtte organiske væskefilmer, med et volum på 1,5 μl hver, ble avsatt på teflonstykket. Diameteren til filmene var cirka 6 mm og passet til brønnenes åpninger. Brønnene ble fylt med prøveløsning og løsningen ble pH-justert med NaOH til konsentrasjon 40 mM. Biologiske prøver ble pH-justert med NaOH til en konsentrasjon på 80 mM. Ekstraksjonsenheten ble dekket med lokk og deretter plassert på en ryster VV3 fra VWR (Herlev, Danmark) for risting med en hastighet på cirka 1500 rpm.

Etter ekstraksjonen ble prøveløsningen fjernet fra brønnene og ekstraksjonsenheten ble skrudd fra hverandre slik at teflonen kunne benyttes videre til analyse. Dråper av prøveløsningen som var igjen på teflonoverflaten ble absorbert opp med medisinske servietter fra Kimberly-Clark Professional (Surre, United Kingdom). Teflonen ble så plassert ved hjelp av dobbeltsidig teip på en mikroskopplate fra VWR (Herlev, Danmark) og plassert slik at den siden av teflonen som ikke hadde vært i kontakt med prøveløsningen vendte opp. Totalt åtte væskefilmer kunne da analyseres. Figur 5 a-d viser framgangsmåten ved ekstraksjonen og etterfølgende DESI-MS.



Figur 5: Framgangsmåte ved ekstraksjon: a) Teflonen festes med en ramme til den nederste delen av ekstraksjonsenheten. Åtte væskefilmer avsettes på teflonen. b) Brønnene plasseres i rammen, over væskefilmene, og skrues fast. Prøveløsning fylles i brønnene. c) Lokk festes over brønnene og enheten settes på risting. d) Etter ekstraksjonen åpnes lokket og prøveløsningen fjernes fra brønnene. Ekstraksjonsenheten skrues opp og teflonen tas ut. Teflonen festes til en mikroskopplate og væskefilmene analyseres så med DESI-MS.

5.2 DESI-MS

5.2.1 Utstyr for DESI-MS

Alle prøvene ble analysert med LTQ XL lineær ionefelle massespektrometer fra Thermo Fisher Scientific (San Jose, California, USA) med en DESI-enhet festet til massespektrometeret. Denne kilden har en motorisert mikroskopszene fra Märzhäuser Wetzlar (Wetzlar, Tyskland) som ble styrt av et hjemmelaget dataprogram. Mikroskopsenen kunne styres både manuelt og automatisk. Sprøytepumpen KDS-100-CE (Holliston, Massachusetts, USA) og Hamilton sprøyte 500 μ l (Bonaduz, Sveits) ble benyttet for å levere sprayløsemiddelet. Xcalibur 2.0.7 fra Thermo Fisher Scientific (San Jose, California, USA) ble benyttet til databehandlingen.

5.2.2 Betingelser for DESI-MS

Teflonen ble etter ekstraksjonen plassert på en mikroskopplate fra VWR Bie & Bertnsen A/S (Herlev, Danmark). Mikroskopplaten ble deretter festet til den motoriserte scenen ved bruk av tack-it tape. Distansen fra sprayen og overflaten var 1,5 mm. Sprayen var posisjonert 55° i forhold til platen og foran MS-inngangskapillæret med en avstand på 3 mm. En elektrode mellom MS-apparatet og sprøytenålen tilførte sprayløsningen en spenning på +5 kV. Nitrogengass med trykk på 7 bar ble benyttet for å danne en aerosol av sprayløsningen. Sprayløsningen ble levert fra sprøyten med en hastighet på 3 μ l/min. Temperaturen i MS-apparatet var 350 °C. Maksimum injeksjonstid var 100 ms og to mikroskans ble summert for hvert spekter.

Alle prøvene ble analysert i fullscan-modus i m/z-området 120-600. Væskefilmene ble analysert ved at den motoriserte scenen ble innstilt til å bevege seg horisontalt fra venstre til høyre med en hastighet på 1 mm/s. På hvert stykke teflon var det åtte væskefilmer som kunne analyseres. Disse åtte prøvene var fordelt på to rekker med fire prøver på hver rekke. Den motoriserte scenen beveget seg slik at en rekke med fire væskefilmer ble presentert for sprayen og MS-kapillæret under en analyse. Analysetiden for fire væskefilmer var cirka 1 minutt. Analyttene ble observert ved m/z-verdien for den protonerte analytten. For integrering ble ekstraherte ionekronogram (EIC) med et vindu på ± 1 m/z-enhet ekstrahert fra fullscan-dataene.

En prøve ble analysert med MS/MS-modus. Kollisjonsenergi ble i denne analysen satt til 15 og det ble scannet i m/z-området 70-600.

5.3 Veieeksperiment

Veiing av væskefilmene ble utført på vekten Mettler Toledo AG285 (Columbus, Ohio, USA).

5.4 LC-MS

Væsekromatografi med MS-detektor ble benyttet for å analysere prøveløsningen etter ekstraksjonen. Instrumentet Agilent 1100 (Santa Clara, California, USA) med en Thermo LCQ Deca XP Plus ionefelle MS ble benyttet til disse analysene. Kolonnen som ble brukt til separasjon av stoffene var en C18 synergi fusion-RP 80 100 x 2mm 4µm fra Phenomenex (Torrance, California, USA). Injeksjonsvolumet var 5 µl og kolonnnetemperaturen ble satt til 30 °C. Sprayspenningen var 4 kV, kapillærtemperaturen var 270 °C og kapillærspenningen 36 V. Fullscan-modus ble benyttet for å skanne i m/z-området 50-2000. Tre mikroskans ble summert for hvert spekter og maksimum injeksjonstid var 50 ms.

Mobilfase A var milliQ-vann med 0,1 % HCOOH, mens mobilfase B var metanol med 0,1 % HCOOH. Mobilfase-flow ble satt til 250 µl/min og alle prøvene ble analysert etter dette gradientprogrammet:

Fra 0-4 minutter økte B fra 5 % til 90 %. Fra 4-5 minutter ble denne sammensetningen av A og B holdt konstant. Fra 5-5,10 minutter gikk mobilfase B fra 90 % og tilbake til 5 %. Denne sammensetningen ble holdt konstant fra 5,10-9 minutter.

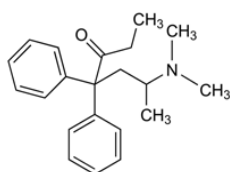
For LC-MS-analysene med morfin, amfetamin og metamfetamin ble kolonnen Luna C18(2) 100A 100 x 2mm 3µm fra Phenomenex (Torrance, California, USA) benyttet til separasjon av stoffene. Mobilfase A var milliQ-vann med 0,1 % HCOOH, mens mobilfase B var metanol med 0,1 % HCOOH. Mobilfase-flow ble satt til 250 µl/min og alle prøvene ble analysert isokratisk i 0-9 min med A: 90 % og B: 10 %. De andre LC-MS-parameterne var som beskrevet over.

5.5 Karakteristikk av modellanalyttene

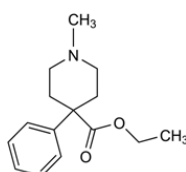
Seks basiske legemidler med relativt lipofile egenskaper ble valgt som modellanalytter. Tabell 1 gir en oversikt over modellanalyttene og internstandardens egenskaper. Figur 6 viser deres struktur.

Tabell 1: Karakteristikk av modellsubstansene og internstandard [43].

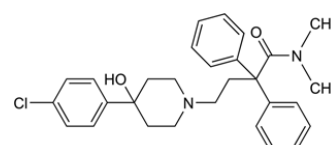
| Navn | Molekylformel | Molekylvekt (dalton) | pKa | Log P |
|-----------------------------|---|-------------------------|------|-------|
| Metadon | C ₂₁ H ₂₇ NO | 309,5 | 8,3 | 3,93 |
| Petidin | C ₁₅ H ₂₁ NO ₂ | 247,3 | 8,7 | 2,7 |
| Loperamid | C ₂₉ H ₃₃ ClN ₂ O ₂ | 477,04 | 8,66 | 5,2 |
| Haloperidol | C ₂₁ H ₂₃ ClFNO ₂ | 375,9 | 8,3 | 3,23 |
| Nortriptylin | C ₁₉ H ₂₁ N | 263,4 | 10,1 | 4,51 |
| Amitriptylin | C ₂₀ H ₂₃ N | 277,40 | 9,4 | 4,92 |
| Amitriptylin-d ₆ | C ₂₀ H ₂₉ N | 283,40 | 9,4 | 4,92 |



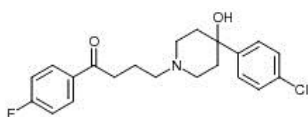
Metadon



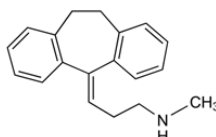
Petidin



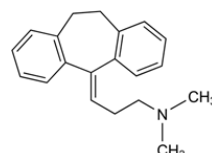
Loperamid



Haloperidol



Nortriptylin



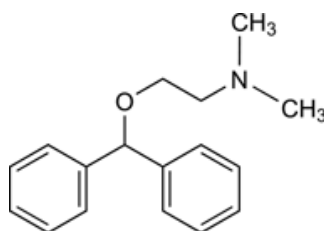
Amitriptylin

Figur 6: Strukturformler av modellanalyttene [43].

I siste del av oppgaven er eksperimenter med difenhydramin beskrevet. Tabell 2 gir karakteristikk av difenhydramin og internstandarden difenhydramin- d₅. Figur 7 viser strukturformelen til difenhydramin.

Tabell 2: Karakteristikk av difenhydramin og difenhydramin-d₅ [43].

| Navn | Molekylformel | Molekylvekt (dalton) | pKa | Log P |
|------------------------------|------------------------------------|-------------------------|------|-------|
| Difenhydramin | C ₁₇ H ₂₁ NO | 255,40 | 8,98 | 3,27 |
| Difenhydramin-d ₅ | C ₁₇ H ₂₆ NO | 260,40 | 8,98 | 3,27 |



Difenhydramin

Figur 7: Strukturformel av difenhydramin [43].

5. 6 Løsninger

5.6.1 Stamoppløsninger og standardløsninger

For hver modellanalytt ble det tillaget stamoppløsninger i metanol med konsentrasjon 1 mg/ml. Stamoppløsningen ble lagret ved 5 °C og beskyttet mot lys i kjøleskap.

Standardløsning ble tilberedt ved fortynning av stamoppløsning til ønsket konsentrasjon. Vann, urin, spytt eller blod ble benyttet til å fortynne stamoppløsningen med avhengig av hvilket eksperiment som ble utført.

5.6.2 Biologiske prøver

Ved forsøk med urin, ble det samlet inn morgenurin fra tre friske frivillige personer. Urinen ble lagret ved 5 °C og analyttene ble tilsatt urinene til ønskede konsentrasjoner.

20 ml helblod fra en frisk frivillig ble tappet i heparinglass på Rigshospitalets blodbank (Københavns universitetssykehus, København, Danmark) og lagret ved 5 °C. Blod ble tilsatt analytter til ønskede konsentrasjoner før ekstraksjonen og benyttet de påfølgende dagene etter tappingen.

Spytt ble samlet fra en frisk frivillig person og tilsatt analytter til ønskede konsentrasjoner. Spytt ble benyttet umiddelbart etter innsamling.

5.7 Autentiske prøver

To tabletter *Tylenol PM* fra McNeil Healthcare (Washington, Pennsylvania, USA), som totalt består av 50 mg difenhydramin og 1000 mg paracetamol, ble inntatt av en 76 kg frisk frivillig mann. Urin-, spytt- og blodprøver ble tatt to timer etter inntaket. Blodprøvene ble tappet over på 500 µl heparinglass. Prøvene ble ekstrahert og analysert umiddelbart etter innsamlingen.

5.8 Kjemikalier

Loperamid hydroklorid, amitriptylin hydroklorid, metadon hydroklorid, petidin hydroklorid og difenhydramin hydroklorid ble kjøpt fra Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). Nortriptylin hydroklorid ble kjøpt fra Lundbeck (København, Danmark). Amitriptyline-d₆ hydroklorid og difenhydramin-d₅ hydroklorid kom fra Qmx laboratories (Thaxted, UK).

Morfin hydroklorid ble kjøpt fra Nomeco (København, Danmark), amfetamin hydroklorid og kokain hydroklorid fra Nordisk droge og kjemikalieforretning (København, Danmark), mens metamfetamin hydroklorid kom fra Mecobezon (København, Danmark).

N-heksadekan ble kjøpt fra Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA), metanol fra VWR international (Herlev, Denmark) og maursyre fra Merck (Darmstadt, Germany).

Vann benyttet i eksperimentene var deionisert og renset til 18,2 MΩ·cm i milli-Q-vannrensningssystem fra Millipore (Billerica, Massachusetts, USA).

6. Resultater og diskusjon

6.1 Optimalisering av ekstraksjonen

6.1.1 Væskefilm for analyttene metadon, amitriptylin, nortriptylin, petidin, haloperidol og loperamid

Væskefilmen må, slik som en væskemembran i LPME, oppfylle flere kriterier i forhold til ekstraksjonen. I tillegg må væskefilmen være kompatibel med DESI-MS da analysen skal gjøres direkte på disse filmene.

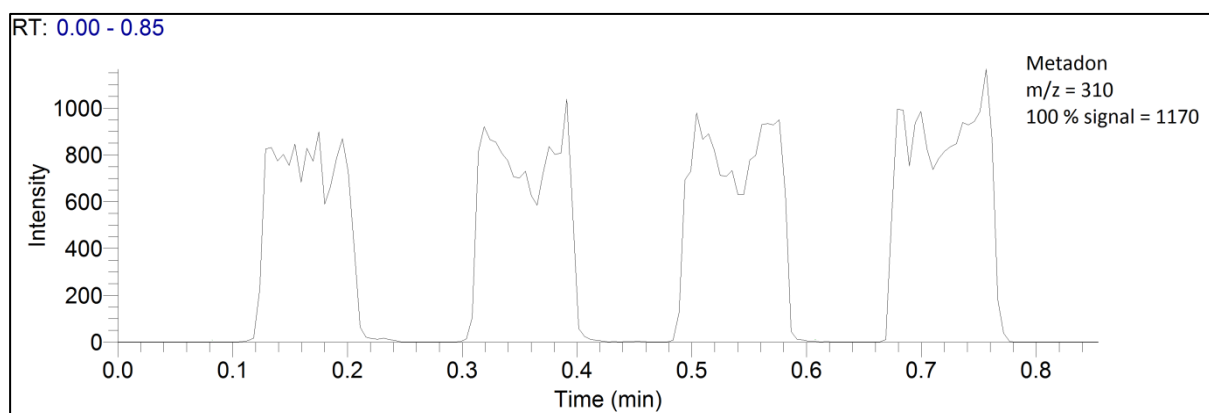
I et tidligere forsøk ble en rekke organiske løsninger immobilisert i polypropylen og testet ut som væskefilmer. Følgende løsninger ble undersøkt: 1-oktanol, toluen, nitrofenyl-oktyleter, laurinsyre-etyler, pentylbenzen, dodekan, bromdodekan og n-heksadekan. Alle væskefilmene ble undersøkt med metadon, nortriptylin, amitriptylin, haloperidol og loperamid som analytter. Vann, tilsatt analyttene til konsentrasjon 1 µg/ml, ble ekstrahert i et stillestående system i 15 minutter. Acetonitrill 1 % HCOOH ble benyttet som sprayløsemiddel for DESI-MS.

Det var svært interessant at analyttene kunne desorberes og ioniseres direkte fra en væskefilm. Likevel var det knyttet problemer til noen av væskefilmene. 1-oktanol, nitrofenyl-oktyleter og laurinsyre-etyler hadde tendens til å ionisere under analysen og ga massespekter som var dominert av selve væskefilmen. For pentylbenzen, toluen, dodekan og bromdodekan var ikke ionisering et problem, men disse så derimot ut til helt eller delvis å fordampe under analysen.

N-heksadekan viste seg å fungere godt som væskefilm. Alle seks modellanalyttene kunne detekteres fra denne filmen etter ekstraksjon av en vandig løsning tilsatt analyttene til konsentrasjon 100 ng/ml. Dette løsemiddelet ioniserte ikke under analysen på grunn av den høye log p-verdien (Log p 10,22). Den høye log p-verdien vil også føre til prøveopprensning da det bare er hydrofobe stoffer som kan ekstraheres over til denne væskefilmen. I tillegg var n-heksadekan mindre flyktig enn de andre løsemidlene på grunn av høyt kokepunkt (287 °C). Denne løsningen kunne også immobiliseres i teflon. N-heksadekan ble valgt som væskefilm for væskefilm-mikroekstraksjon.

Figur 8 viser EIC fra en analyse av væskefilmene etter ekstraksjon av fire vandige prøver med metadon. Figuren viser at det var mulig å ekstrahere legemidler over til en væskefilm av n-

heksadekan, for deretter å desorbere og ionisere disse fra væskefilmen med DESI-MS. Ekstraksjonsparameterne (som er oppgitt under figuren) diskuteres senere i oppgaven.



Figur 8: EIC for metadon.

Prøvevolum: 150 µl (vann); ekstraksjonstid 10 min; analyttkonsentrasjon: 500 ng/ml; NaOH-konsentrasjon: 40 mM

6.1.2 Stabiliteten til n-heksadekan

Analyttene ble analysert fra væskefilmer og ikke fra tørkede ekstrakter. Væskefilmene måtte derfor ikke fordampe under ekstraksjonen og analysen.

Prosent tap av den organiske fasen ble beregnet etter en time fra deponering på teflonen.

Teflonen ble festet til ekstraksjonsutstyret og åtte organiske væskefilmer med volum 1,5 µl ble avsatt på teflonen. Ekstraksjonsutstyret med teflonen ble veid rett etter deponering av n-heksadekan. Teflonen ble oppbevart i romtemperatur (cirka 25°C) i en time og så veid på nytt. Det ble utført tre paralleller. Kalkulert tap (%) av væskefilmen er vist i tabell 3.

Tabell 3: Prosent tap av væskefilm etter en time oppbevaring.

| Parallell | Tap av væskefilm (%) |
|-----------|----------------------|
| 1 | 0,93 |
| 2 | 0,00 |
| 3 | 0,78 |

Volum væskemembran: 1,5 µl; 1 time oppbevaring; 25°C

For alle tre parallellene var tap av væskefilm etter en time oppbevaring under 1 %. Forsøket viste at filmene ville være stabil under ekstraksjon og analyse, forutsatt at dette ble utført innen en time etter at n-heksadekan ble deponert på teflonen.

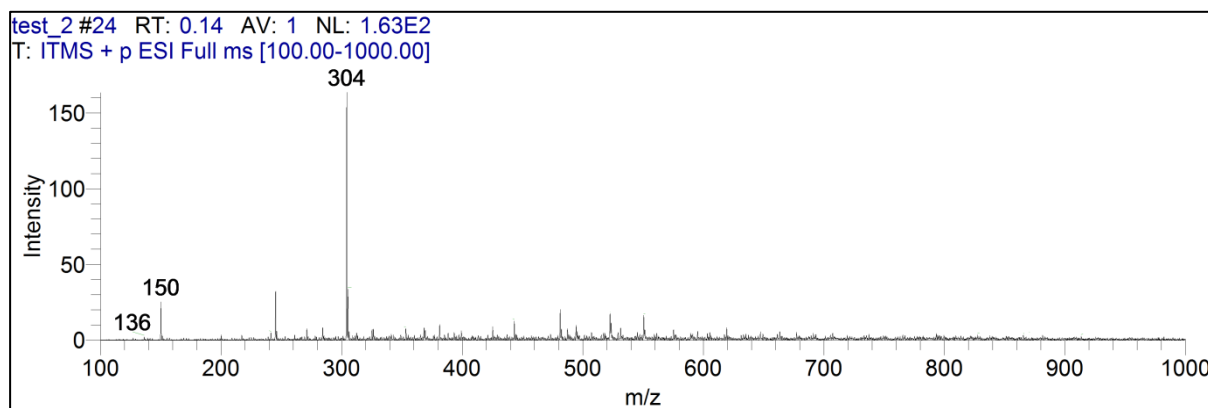
6.1.3 Væskefilm for analyttene morfin, amfetamin og metamfetamin

N-heksadekan er en organisk væske med høy lipofilisitet. De seks modellanalyttene har relativt høye log p-verdier (se tabell 1 under eksperimenter), og kunne dermed ekstraheres over i denne væsken. For legemidler med lavere log p-verdi kan n-heksadekans lipofile karakter gjøre at disse stoffene i liten grad ekstraheres. Fire typiske misbruksstoffer med ulike log p-verdier, vist i tabell 4, ble ekstrahert fra vandig løsning med analyttene i konsentrasjon 1 µg/ml. N-heksadekan ble benyttet som væskefilm og ekstraksjonen ble utført i 10 minutter.

Tabell 4: Log p-verdier for morfin, amfetamin, metamfetamin og kokain [43].

| Substans | Morfin | Amfetamin | Metamfetamin | Kokain |
|----------|--------|-----------|--------------|--------|
| Log p | -0,10 | 1,81 | 2,07 | 2,30 |

Et representativt massespekter fra analysen med DESI-MS etter ekstraksjonen er vist i figur 9. Kokain var den eneste av de fire substansene som kunne observeres med god signalintensitet. Dette var også substansen med høyest log p-verdi av de fire stoffene. Amfetamin og metamfetamin viste svake signaler. De ekstraherte ionekronogrammene fra disse stoffene kunne ikke benyttes til kvantifisering. Signal fra morfin var fraværende.



Figur 9: Massespekteret viser amfetamin m/z 136, metamfetamin m/z 150 og kokain m/z 304. *Prøvevolum: 150 µl (vann); ekstraksjonstid: 10 minutter; analyttkonsentrasjon: 1 µg/ml; NaOH- konsentrasjon: 40 mM*

11 nye organiske løsemidler ble testet ut som væskefilmer for analyttene morfin, amfetamin og metamfetamin. For hvert løsemiddel ble det utført minst åtte prøveparalleller. De tre analyttene ble ekstrahert fra vandige løsninger med analytten i konsentrasjon 1 µg/ml. Ekstraksjonen ble utført i 10 minutter. Væskefilmene ble analysert med MeOH 1 % HCOOH:H₂O i forholdet 75:25 som sprayløsemiddel (optimalisering av sprayløsemiddel diskuteres i avsnitt 6.2).

De 11 organiske løsemidlene som ble testet var: 2-oktanon, 1-oktanol, 1-pentanol, nonanol, 2-oktyl-1-dodekanol, 2-undekanon, n-dodekan, tetraklorofenylpolydimetylsiloksan, polyfenylmetylsiloksan, poly-3,3,3-trifluoropropylmetylsiloksan og silikonolje AS4.

1-oktanol, nonanol, 2-oktyl-1-dodekanol og polyfenylmetylsiloksan kunne ikke immobiliseres inn i teflonen. Disse la seg som dråper på teflonens overflate, sannsynligvis fordi disse var for hydrofile eller for viskøse til å trekke inn i teflonen.

Løsemidlene som lot seg immobilisere i teflonen ble analysert med DESI-MS etter ekstraksjonen. De organiske fasene 2-oktanon, 1-pentanol, n-dodekan, tetraklorofenylpolydimetylsiloksan og silikonolje fordampet etter deponering på teflonen eller under DESI-MS-analysen. Poly-3,3,3-trifluoropropylmetylsiloksan og 2-undekanon trakk langsomt inn i teflonen. 2-undekanon fordampet også under analysen.

Morfin kunne ikke detekteres fra noen av væskefilmene. Silikonolje AS4 og 1-pentanol så ut til å gi høyest signalintensitet for amfetamin og metamfetamin. Signalintensiteten var likevel for svake til at de ekstraherte ionekronogrammene kunne integreres.

Det ble også forsøkt å blande n-heksadekan med andre organiske løsemidler. N-heksadekan tilsatt et mer hydrofilt løsemiddel kunne gjøre væskefilmen mindre lipofil. N-heksadekan ble blandet med 1-oktanol i forholdet 50:50 og 80:20, med 1-petanol i forholdet 50:50 og 80:20 og med 2-oktanon i forholdet 50:50 og 80:20. Ingen av blandingene så ut til å ekstrahere morfin. For amfetamin og metamfetamin så n-heksadekan:2-oktanon i forholdet 80:20 ut til å fungere noe bedre enn ved bruk av bare n-heksadekan som væskefilm. Signalintensitetene var likevel svake og de ekstraherte ionekronogrammene kunne heller ikke her benyttes til kvantifisering.

6.1.4 LC-MS-analyse av analyttene morfin, amfetamin og metamfetamin i prøveløsningen

Det ble undersøkt hvor godt analyttene morfin, amfetamin og metamfetamin ble ekstrahert over i væskefilmene. Vann tilsatt analyttene til konsentrasjon 1 µg/ ml ble ekstrahert. Prøveløsningene ble analysert med LC-MS etter 10 minutter ekstraksjon og etter 20 minutter ekstraksjon. Etter ekstraksjonen ble 80 µl av donorfasen fra hver brønn overført til vialer og pH-justert med 5 µl 5 % maursyre før LS-MS-analysen. Det ble utført fire prøveparalleller for hver ekstraksjonstid. Som referanse (0 min) ble uekstrahert prøveløsning med samme konsentrasjon benyttet. Tabell 5 viser en oversikt over prosent av analyttene igjen i prøveløsningen etter 0 minutter ekstraksjon, 10 minutter ekstraksjon og 20 minutter ekstraksjon.

Tabell 5: Prosent (%) morfin, amfetamin og metamfetamin i prøveløsningen etter ekstraksjonstid på 0 minutter, 10 minutter og 20 minutter.

| Tid | Mengde analytt i prøveløsningen (%) | | |
|--------|-------------------------------------|-----------|--------------|
| | Morfin | Amfetamin | Metamfetamin |
| 0 min | 100 | 100 | 100 |
| 10 min | 99 | 78 | 70 |
| 20 min | 98 | 77 | 73 |

Prøvevolum: 150 µl (vann); ekstraksjonstid: 0-20 min; analyttkonsentrasjon: 1 µg/ml; NaOH-konsentrasjon 40mM

Konsentrasjon morfin i prøveløsningen var uendret etter 20 minutter ekstraksjon. Dette viste at morfin ikke ble ekstrahert over i væskefilmene. Morfin er et zwitterion og har lav log p-verdi. Morfin lar seg derfor ikke ekstrahere over i en organisk væske med høy log p-verdi. Mengden av amfetamin og metamfetamin i prøveløsningen ble redusert med mellom 20-30 % etter 10 minutter ekstraksjon. Ytterligere ekstraksjon økte ikke utbytte av disse. Amfetamin og metamfetamin har høyere log p-verdi enn morfin og vil i større grad kunne ekstraheres over i de organiske væskefilmene. Fra disse to stoffene ble det også observert svake signaler som vist i figur 9.

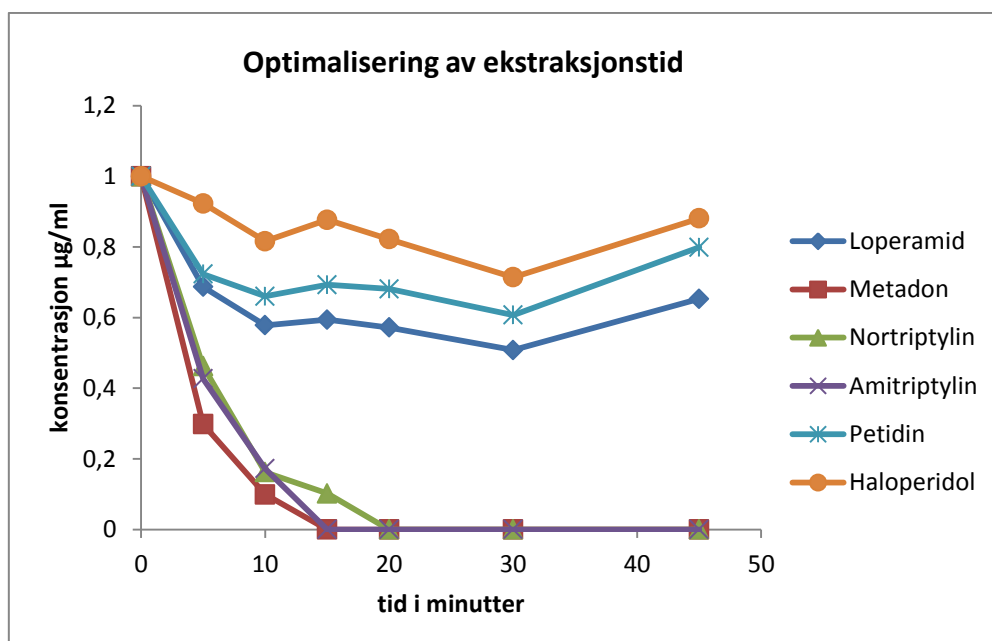
N-heksadekan setter begrensninger for hvilke analytter væskefilm-mikroekstraksjonen kan anvendes på. Andre mer polare væskefilmer, eller en væskefilm som består av en blanding mellom n-heksadekan og et mindre lipofilt løsemiddel bør undersøkes videre. En annen løsning for å ekstrahere disse stoffene er bruk av bærermediert transport. Analyttene morfin og amfetamin har tidligere vist seg å kunne ekstraheres med bærere i 3-fase LPME [44]. Elektromembranekstraksjon vil være en tredje mulighet for å bedre ekstraksjonen. Dette vil endre ekstraksjonskinetikken og maksimalt utbytte vil kunne oppnås hurtigere enn når bare passiv diffusjon er drivkraften i ekstraksjonen [18]. Disse metodene ble ikke testet ut i dette prosjektet og n-heksadekan ble benyttet videre som væskefilm.

6.1.5 LC-MS-analyse av analyttene metadon, amitriptylin, nortriptylin, petidin, haloperidol og loperamid i prøveløsningen

For å bestemme optimal ekstraksjonstid for de seks modellanalyttene, ble prøveløsningene analysert med LC-MS etter ekstraksjonen.

Vann tilsatt analyttene til konsentrasjon 1 µg/ml ble ekstrahert. Ekstraksjonstidene som ble undersøkt var 5 minutter, 10 minutter, 15 minutter, 20 minutter, 30 minutter og 45 minutter. Etter ekstraksjonen ble 80 µl fra hver brønn pipettert ut og overført til vialer. Prøveløsningen ble pH-justert med 5 µl 5 % maursyre før LC-MS-analysen. Det ble utført åtte paralleller for hver ekstraksjonstid. En kalibreringskurve med konsentrasjonene 0,1 µg/ml, 0,5 µg/ml og 1 µg/ml ble tillaget for å beregne konsentrasjonen av analyttene i prøveløsningen etter ekstraksjonen. For hver konsentrasjon ble tre paralleller analysert.

Figur 10 viser konsentrasjonen av de seks modellanalyttene i prøveløsningen etter ulike ekstraksjonstider.



Figur 10: Konsentrasjon av modellanalyttene i prøveløsningen som funksjon av tid.
Prøvevolum: 150 µl (vann); ekstraksjonstid: 5-45 min; analyttkonsentrasjon: 1 µg/ml; NaOH-konsentrasjon: 40 mM

Etter 10 minutter ekstraksjon vil utbyttet være maksimalt for loperamid, haloperidol og petidin. For metadon, amitriptylin og nortriptylin var utbyttet høyt etter 10 minutter ekstraksjon. Ekstraksjon utover dette ville ikke ha stor betydning for utbyttet av disse tre analyttene. 10 minutter ble derfor benyttet som ekstraksjonstid i resten av eksperimentene.

Analyttene ble ekstrahert til en løsning med et volum som var 100 ganger lavere enn volumet til prøveløsningen. Dette førte til oppkonsentrering av analyttene. Tabell 6 viser utbytte og oppkonsentrering av modellanalyttene.

Tabell 6: Utbytte og oppkonsentrering av de seks modellanalyttene etter 10 minutter ekstraksjon.

| Analytt | Utbytte (%) | Oppkonsentrering |
|---------------------|-------------|------------------|
| Metadon | 90 | 90 |
| Amitriptylin | 83 | 83 |
| Nortriptylin | 84 | 84 |
| Petidin | 34 | 34 |
| Loperamid | 42 | 42 |
| Haloperidol | 18 | 18 |

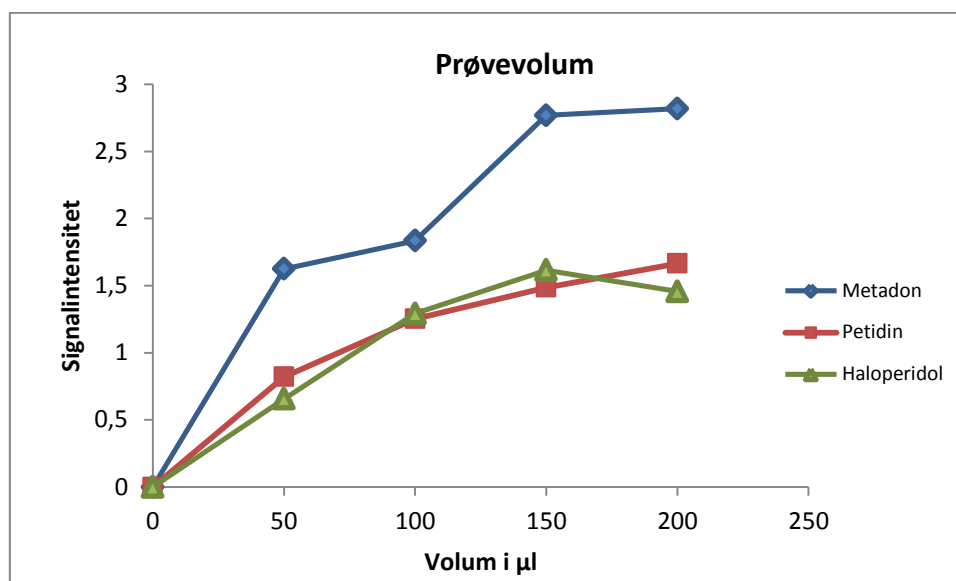
*Prøvevolum: 150 µl (vann); ekstraksjonstid: 10 min;
analyttkonsentrasjon: 1 µg/ml; NaOH-konsentrasjon: 40 mM*

Etter 10 minutter ekstraksjon var utbytte for analyttene mellom 22-91 % og disse var oppkonsentrert mellom 22 og 91 ganger. Utbytte og oppkonsentreringen var høyest for metadon, amitriptylin og nortriptylin. Disse tre analyttene har høy log p-verdi og inneholder få heteroatomer. Petidin og haloperidol har lavere log p-verdi enn disse tre analyttene, mens loperamid inneholder mange heteroatomer. Dette kan forklare at petidin, haloperidol og loperamid i mindre grad ble ekstrahert over til væskefilmene.

6.1.6 Prøvevolum for analyttene metadon, amitriptylin, nortriptylin, petidin, haloperidol og loperamid

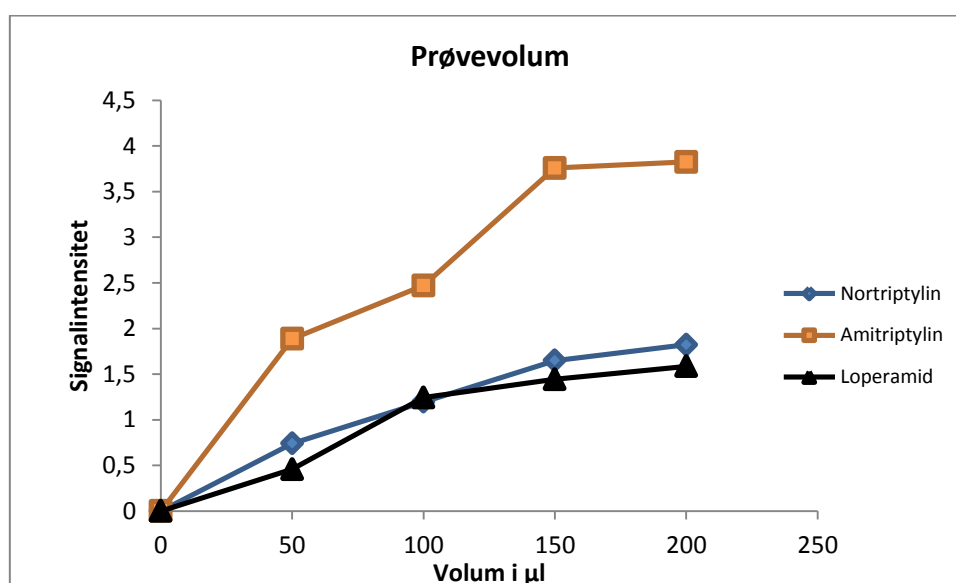
Volumforholdet mellom donorfase og akseptorfase kan ha stor effekt på hvor mye analyttene blir oppkonsentrert [7]. Ulike prøvevolum ble tilsatt brønnene for å undersøke hvordan volumet påvirket konsentrasjonen av modellanalyttene i væskefilmen. Signalintensitetene for analyttene ble sammenliknet etter ekstraksjon av de ulike volumene. Dimensjonene til brønnen begrenset mengde prøveløsning som kunne tilsettes. Volumene som ble undersøkt var 50 µl, 100 µl, 150 µl og 200 µl.

Vann ble tilsatt analyttene til konsentrasjon 50 ng/ml. Ulike prøvevolum ble tilsatt brønnene og ekstrahert i 10 minutter. Det ble utført seks paralleller for hvert volum. Signalintensitet for modellanalyttene ved de ulike prøvevolumene er vist i figur 11 og 12 (vises i to figurer for å unngå at kurvene overlapper).



Figur 11: Signalintensitet for metadon, petidin og haloperidol som en funksjon av prøvevolum. Metadons signalintensitet vises som 1/5.

Prøvevolum: 50-200 µl (vann); ekstraksjonstid: 10 min; analyttkonsentrasjon: 50 ng/ml; NaOH-konsentrasjon: 40 mM



Figur 12: Signalintensitet for nortriptylin, amitriptylin og loperamid som en funksjon av prøvevolum.

Prøvevolum: 50-200 µl (vann); ekstraksjonstid: 10 min; analyttkonsentrasjon: 50 ng/ml; NaOH-konsentrasjon: 40 mM

Signalintensiteten økte fra 50 µl prøveløsning og til 150 µl prøveløsning for alle analyttene. Signalintensitetene for metadon, amitriptylin og haloperidol var uendret fra 150 µl til 200 µl løsning. For analyttene petidin, nortriptylin og loperamid ga et volum på 200 µl cirka 10 % høyere signalintensiteten enn 150 µl. 150 µl ble valgt som optimalt prøvevolum da forskjell i signalintensitet mellom 150 µl og 200 µl donorfase var marginal.

6.2 Optimalisering av DESI-parametere

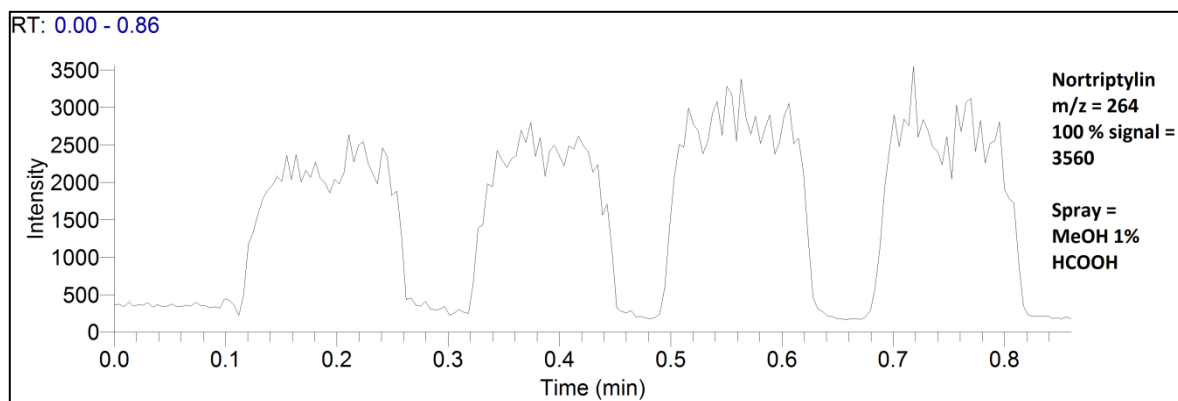
6.2.1 Sprayløsemiddel for analyttene metadon, nortriptylin, amitriptylin, petidin, haloperidol og loperamid

Sprayløsemiddelet er en viktig parameter for desorpsjonsprosessen av analyttene [41]. I dette eksperimentet var det ønskelig å se på variasjonen i signalintensiteten forårsaket av DESI-MS, og ikke variasjonen forårsaket av ekstraksjonen. Det ble derfor utført en væske-væske-ekstraksjon. 1 ml vandig løsning av metadon i konsentrasjon 0,05 mg/ml og NaOH i konsentrasjon 80 mM ble ekstrahert med 1 ml n-heksadekan. Væske-væske-ekstraksjonen ble utført under risting i cirka 10 minutter før den organiske fasen ble avpipettert. For hver sprayløsning ble fire avsetninger på 1,5 µl av den organiske fasen (som inneholdt metadon) deponert på teflonen og analysert med DESI-MS. Mellom hver analyse ble kapillæret, som leverte sprayløsemiddelet i DESI, skyllet med 1 ml av det nye løsemiddelet.

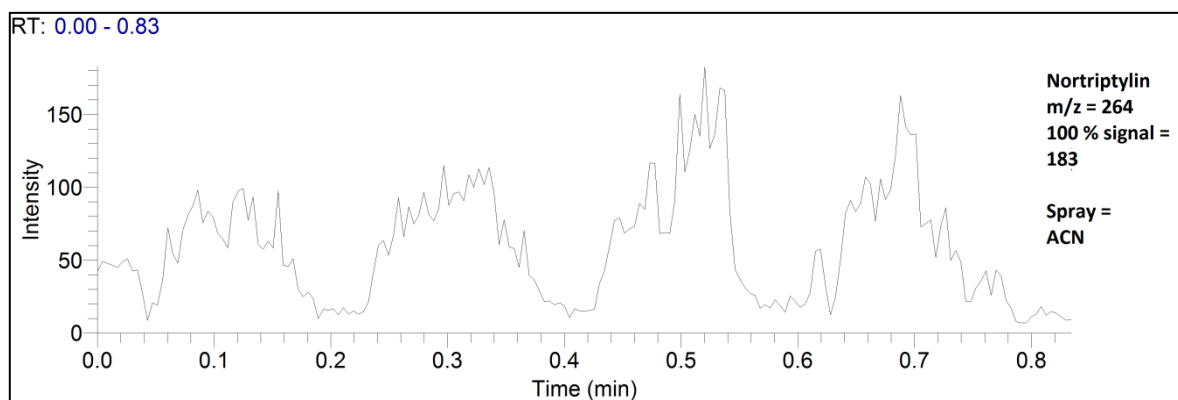
Følgende løsemidler ble testet: acetonitrill, metanol, acetonitrill med 1 % HCOOH, acetonitrill med 1 % NH₃, metanol med 1 % HCOOH, metanol med 1 % NH₃, acetonitrill:kloroform i forholdet 1:1 med 1 % HCOOH, dimetylformamid:acetonitrill i forholdet 1:1, acetonitrill:diklormetan i forholdet 1:1, acetonitrill:heksan:kloroform i forholdet 5:5:3, etanol, 2-propanolol, aceton, dimetylsulfoksid, etylacetat, HCOOH og acetonitrill med 0,5 % HCOOH og 0,5 % NH₃.

De ni løsemidlene som ga høyest signalintensitet ble videre testet på alle seks modellanalyttene. Modellanalyttene ble med samme prosedyre som beskrevet over ekstrahert og analysert. Følgende ni løsemidler ble testet på alle seks modellanalyttene: Metanol, metanol 1 % HCOOH, metanol 1 % NH₃, acetonitrill, acetonitrill 1 % HCOOH, acetonitrill 1 % NH₃, aceton, aceton 1 % HCOOH og aceton 1 % NH₃.

Signalintensiteten ble sammenliknet (oversikt over signalintensitet for analyttene i vedlegg 1). Figur 13 og 14 viser analytten nortriptylin analysert med to forskjellige sprayløsemidler, og illustrerer hvilken betydning valg av løsemiddel hadde for signalintensiteten.



Figur 13: EIC for nortriptylin med MeOH 1 % HCOOH som sprayløsemiddel.



Figur 14: EIC for nortriptylin med acetonitrill som sprayløsemiddel.

Metadon og loperamid ga generelt god signalintensitet med mange av sprayløsningene. Signalintensiteten for de fire andre modellanalyttene varierte mye fra løsemiddel til løsemiddel. Metanol med 1 % HCOOH ga høyest intensitet for alle analyttene. Denne sprayløsningen ble benyttet i resten av eksperimentene der disse analyttene ble analysert.

6.2.2 Sprayløsemiddel for analyttene morfin, amfetamin og metamfetamin

Analyttene morfin, amfetamin og metamfetamin hadde tidligere vist fraværende eller svake signalintensiteter i analyse med DESI-MS etter ekstraksjon. Disse analyttene har mer polar karakter enn modellanalyttene i tabell 1. Det ble undersøkt om vandige sprayløsemidler kunne øke signalintensiteten til disse stoffene.

MeOH 1 % HCOOH:H₂O i forholdet 90:10 og i forholdet 75:25 ble undersøkt som sprayløsemiddel. En vandig løsning med de tre stoffene i konsentrasjon 1 µg/ml og NaOH til konsentrasjon 40 mM ble ekstrahert med n-heksadekan som væskefilm. Deretter ble

væskefilmene analysert med de to vandige løsningsene som spray. For hvert sprayløsemiddel ble åtte prøveparalleller analysert. Mellom hver analyse ble kapillæret, som leverte sprayløsemiddelet i DESI-MS, skyllet med 1 ml av det nye løsemiddelet.

De vandige sprayløsemidlene så ut til å gi noe bedre signalintensitet for metamfetamin og amfetamin. Signal fra morfin var fortsatt fraværende. Dette var ikke uventet da morfin i et tidligere forsøk hadde vist at den ikke ble ekstrahert over til væskefilmene. Det kunne konkluderes med at et mer vandig sprayløsemiddel burde benyttes ved analyse av disse stoffene framfor ren metanol. Likevel var signalintensitetene fremdeles for svake til at de ekstraherte ionekronogrammene kunne integreres. Det ble ikke arbeidet mer med disse tre analyttene i dette prosjektet.

6.3 Biologiske prøver

For å undersøke om metoden var kompatibel med biologiske prøver ble urin, spytt og helblod testet ut som matriks.

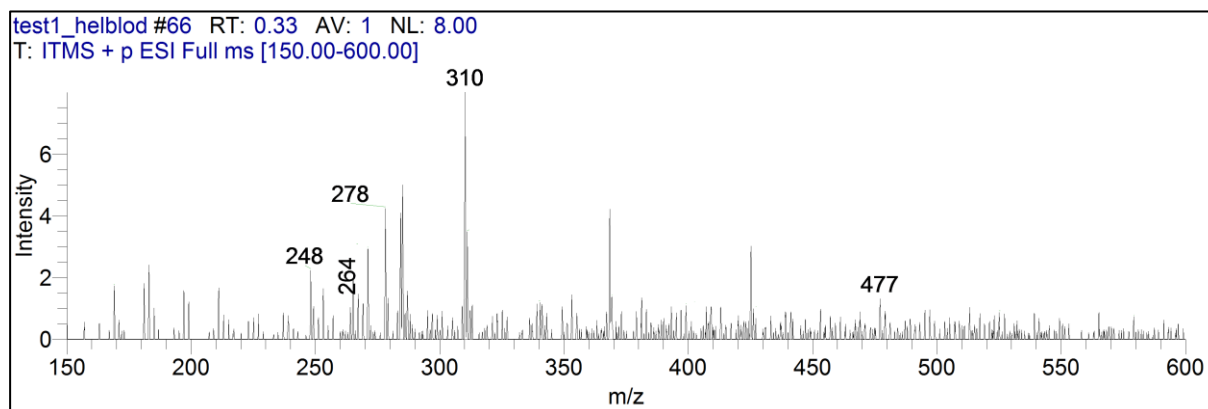
Urin, spytt og helblod fra en frisk person ble tilsatt modellanalyttene til konsentrasjon 1 µg/ml og pH-justert med NaOH. I eksperimentene med vandige matriks ble NaOH i konsentrasjon 40 mM benyttet for å gjøre prøveløsningen basisk. For de biologiske matriksene måtte NaOH til konsentrasjon 80 mM tilsettes for å sikre fullstendig deprotonering av analyttene.

Bufferkomponenter i de biologiske matriksene kan være årsak til dette. I tillegg ble blanke prøver for alle tre matriksene ekstrahert og analysert.

Alle seks modellanalyttene kunne detekteres etter ekstraksjon fra urin og spytt. Etter ekstraksjon av helblod kunne alle analyttene utenom haloperidol detekteres. De blanke prøvene ga ingen signal fra analyttene. Metoden var altså kompatibel med biologiske prøver.

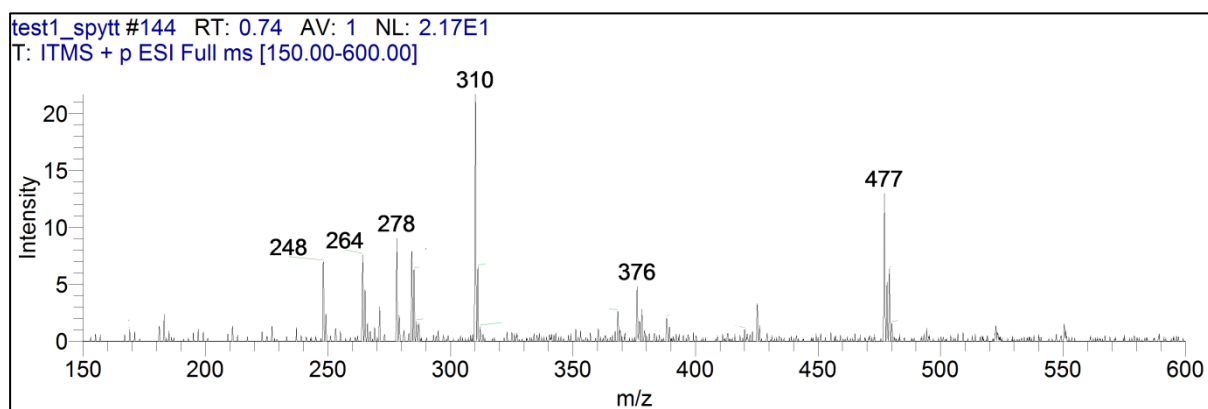
Det var også interessant å undersøke om analyttene i terapeutiske konsentrasjoner kunne detekteres fra biologiske prøver. Terapeutisk referanseområde for metadon i serum er mellom 180-370 ng/ml [45]. Metadon er et legemiddel med misbrukspotensial. Hurtig analysesvar kan være viktig for raskt å kunne bekrefte eller avkrefte om dette stoffet er tilstede i en blodprøve. Helblod og spytt ble tilsatt modellanalyttene til konsentrasjon 100 ng/ml og

ekstrahert. Figur 15 og 16 viser henholdsvis massespekter fra helblod og spytt tilsatt modellanalyttene til konsentrasjon 100 ng/ml.



Figur 15: Massespekteret etter analyse av helblod viser petidin m/z 248, nortriptylin m/z 264, amitriptylin m/z 278, metadon m/z 310 og loperamid m/z 477.

Prøvevolum: 150 µl (helblod); ekstraksjonstid: 10min; analyttkonsentrasjon: 100 ng/ml; NaOH-konsentrasjon: 80 mM



Figur 16: Massespekteret etter analyse av spytt viser petidin m/z 248, nortriptylin m/z 264, amitriptylin m/z 278, metadon m/z 310, haloperidol m/z 376 og loperamid m/z 477.

Prøvevolum: 150 µl (spytt); ekstraksjonstid: 10 min; analyttkonsentrasjon: 100 ng/ml; NaOH-konsentrasjon: 80 mM

Metadon, petidin, nortriptylin og amitriptylin viste relativt gode signalintensiteter etter ekstraksjon av helblod og spytt med konsentrasjon 100 ng/ml av disse analyttene. I helblod var signalintensitet fra loperamid svak og signal fra haloperidol var fraværende.

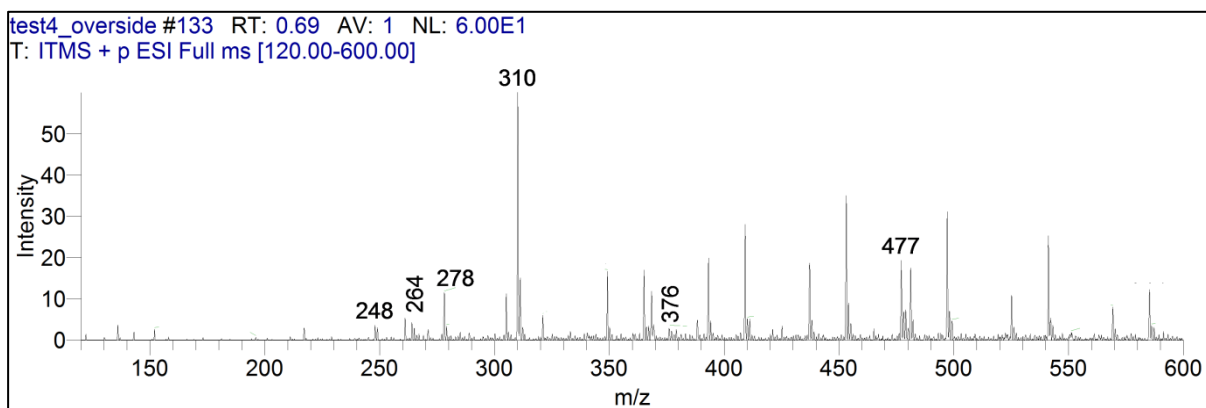
Signalintensitetene fra spytt så generelt ut til å være noe høyere enn fra blod. Helblod er en viskøs matriks og ekstraksjonshastigheten vil kunne nedsettes [13]. I tillegg kan helblod gi koaguleringsproblemer og legemidler kan binde seg til proteiner i blodet. Dette kan forklare at analyttene ga høyere signalintensitet ved ekstraksjon fra spytt.

Ekstraksjon fra helblod så ut til å være mer problematisk enn ekstraksjon fra urin og spytt. Likevel kunne metadon påvises fra helblod som var tilsatt analytten i terapeutisk konsentrasjon.

6.4 Analyse av *under-* og *oversiden* av væskefilmene

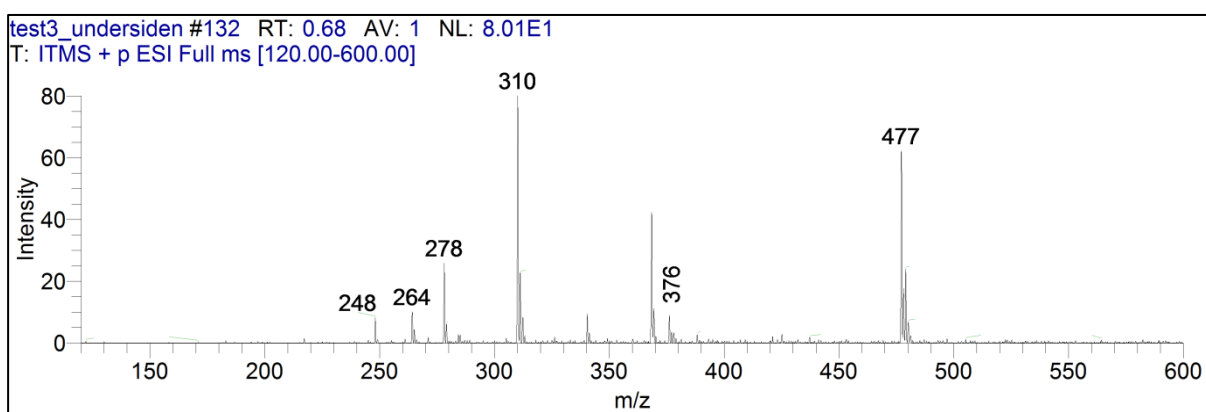
Teflonen som ble benyttet til immobilisering av væskefilmene har en tykkelse på 0,2 mm. Diffusjonsveien for den organiske fasen og legemidlene var altså kort og væskefilmene kunne dermed analyseres fra begge sidene av teflonen. Bare den ene siden av væskefilmene var i direkte kontakt med prøveløsningen, heretter kalt *oversiden*. I eksperimentene som allerede er beskrevet ble filmene analysert fra den siden som ikke hadde vært i kontakt med prøveløsningen, heretter kalt *undersiden*. I dette eksperimentet ble det undersøkt om det kunne observeres forskjell mellom analyse av *oversiden* og *undersiden* av væskefilmene.

Urin ble valgt som matriks da dette er mer komplekst enn vann. Urin fra en frisk person ble tilsatt modellanalyttene til konsentrasjon 100 ng/ml. Det ble tilsammen utført 16 ekstraksjoner. Åtte væskefilmer ble etter ekstraksjonen analysert fra *oversiden* av væskefilmene. Nye åtte ekstraksjoner ble deretter utført og væskefilmene ble analysert fra *undersiden*. Figur 17 og 18 (på neste side) viser massespektrene fra analyse av henholdsvis *oversiden* og *undersiden* av væskefilmene etter ekstraksjon av urin.



Figur 17: Massespekteret fra analyse av *oversiden* av væskefilmene viser petidin m/z 248, nortriptylin m/z 264, amitriptylin m/z 278, metadon m/z 310, haloperidol m/z 376 og loperamid m/z 477.

Prøvevolum: 150 μ l (urin); ekstraksjonstid: 10 min; analyttkonsentrasjon: 100 ng/ml; NaOH-konsentrasjon: 80 mM



Figur 18: Massespekteret fra analyse av *undersiden* av væskefilmene viser petidin m/z 248, nortriptylin m/z 264, amitriptylin m/z 278, metadon m/z 310, haloperidol m/z 376 og loperamid m/z 477.

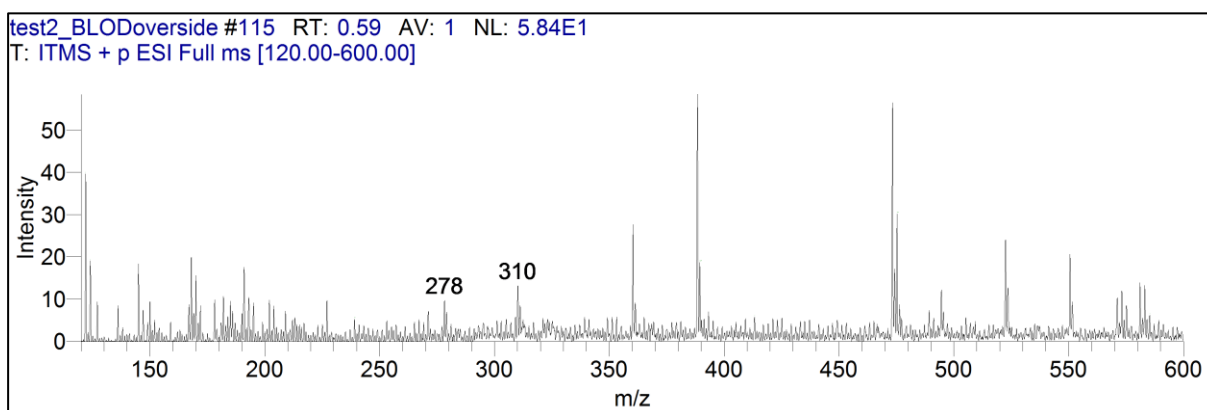
Prøvevolum: 150 μ l (urin); ekstraksjonstid: 10 min; analyttkonsentrasjon: 100 ng/ml; NaOH-konsentrasjon: 80 mM

Massespektrene fra væskefilmene *overside* viste en rekke signaler fra andre stoffer enn modellanalyttene. Dette skyldes sannsynligvis matrikseffekter fra urinen som var igjen på overflaten etter ekstraksjonen. Analyse av *undersiden* av teflonen reduserte signaler fra andre stoffer enn modellanalyttene. Signalintensitetene for analyttene var også høyere ved analyse av *undersiden* av væskefilmene. Dette kan tyde på at ioneundertrykking ble redusert ved å analysere *undersiden* av væskefilmene.

Oversiden og *undersiden* av filmene ble også analysert med helblod som matriks. Helblod er en viskøs matriks og kan være vanskelig å fjerne fra overflaten etter ekstraksjonen. Helblod ble tilsatt modellanalyttene til konsentrasjon 100 ng/ml og det ble utført totalt åtte

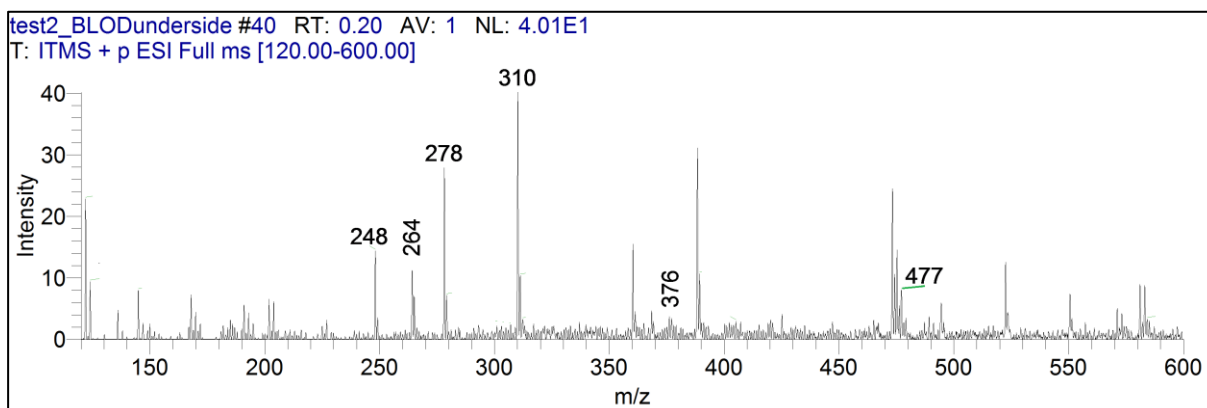
ekstraksjoner. Fire av væskefilmene ble analysert fra *oversiden* av teflonen, mens fire av væskefilmene ble analysert fra *undersiden* av teflonen.

Figur 19 og 20 viser massespektrene fra analyse av henholdsvis *oversiden* og *undersiden* av væskefilmene etter ekstraksjon av helblod. Signalintensitetene fra modellanalyttene var svake eller fraværende ved analyse av *oversiden* av væskefilmene. Intensiteten ble høyere ved analyse av *undersiden* av filmene.



Figur 19: Massespekteret fra analyse av *oversiden* av væskefilmene viser amitriptylin m/z 278 og metadon m/z 310.

Prøvevolum: 150 μ l (helblod); ekstraksjonstid: 10 min; analyttkonsentrasjon: 100 ng/ml; NaOH-konsentrasjon: 80 mM



Figur 20: Massespekteret fra analyse av *undersiden* av væskefilmene viser petidin m/z 248, nortriptylin m/z 264, amitriptylin m/z 278, metadon m/z 310, haloperidol m/z 376 og loperamid m/z 477.

Prøvevolum: 150 μ l (helblod); ekstraksjonstid: 10 min; analyttkonsentrasjon: 100 ng/ml; NaOH-konsentrasjon: 80 mM

Matrikskomponenter på overflaten (etter ekstraksjonen) ble unngått ved å analysere *undersiden* av væskefilmene. Dette førte til redusert ioneundertrykking og bedre signalintensiteter fra analyttene.

6.5 Internstandard

Både DESI-prosessen og ekstraksjonen gir bidrag til variasjoner i signalintensiteten. I tillegg vil volum n-heksadekan som avsettes på teflonen kunne variere. Diameteren til væskefilmen som sprayen beveger seg over (den diameteren som blir analysert) vil også endre seg fra analyse til analyse. Dette vil gi variasjoner i topparealene for analyttene. For å korrigere for slike variasjoner må en internstandard tilsettes prøvene. Internstandarden bør oppføre seg likt analyttene under ekstraksjonen og analysen. Amitriptylin-d₆ ble valgt som internstandard for alle analyttene.

Det ble undersøkt hvor godt amitriptylin-d₆ fungerte som internstandard for modellanalyttene. Vann ble tilsatt modellanalyttene og internstandard til konsentrasjon 1 µg/ml. Deretter ble 24 prøver ekstrahert. Relativt standardavvik (RSD) for de 24 topparealene ble utregnet for hver analytt, både med og uten korrigering med internstandarden. RSD for topparealene (n=24) med og uten korrigering med internstandard (IS) er vist i tabell 7.

Tabell 7: RSD for topparealene (n=24) med og uten korrigering med internstandard (IS).

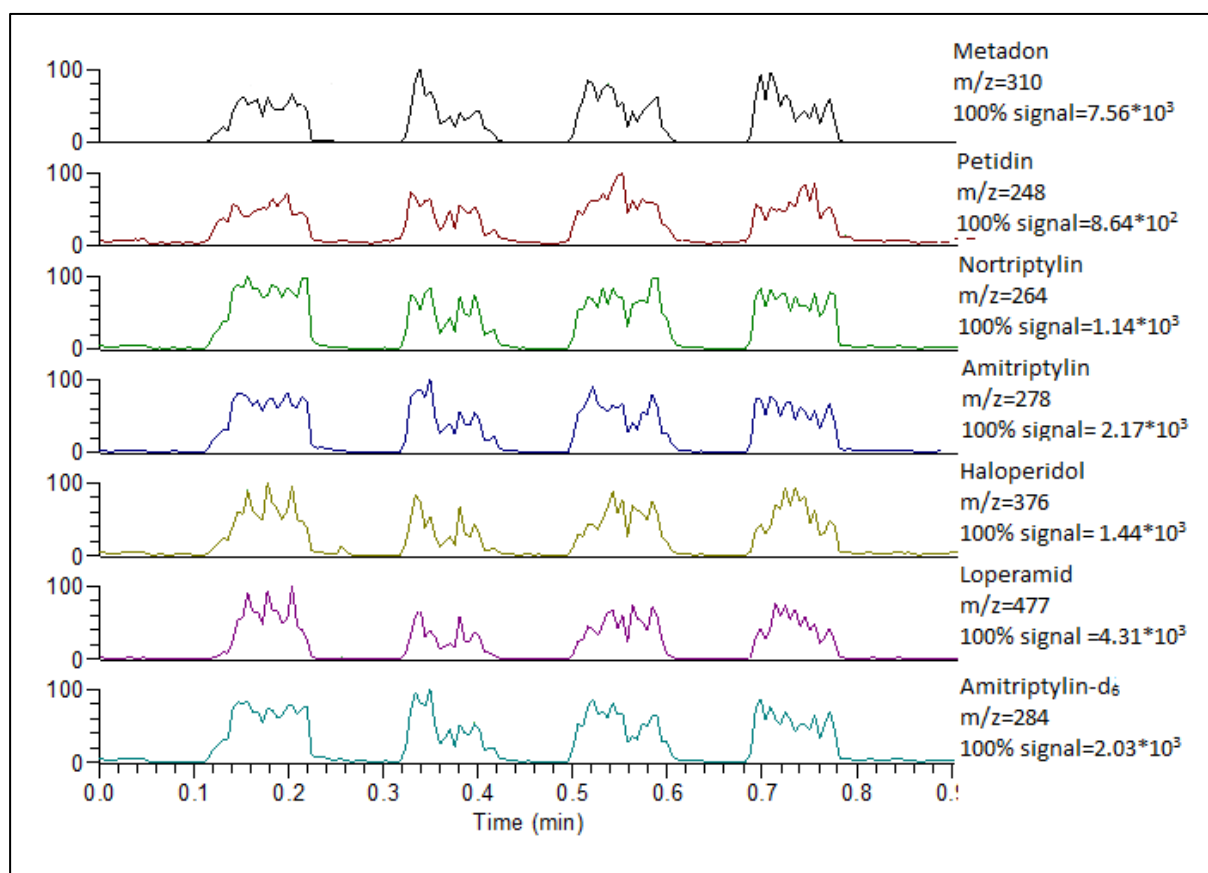
| Analytt | Uten IS (%) | Med IS (%) |
|---------------------|-------------|------------|
| Metadon | 34 | 27 |
| Nortriptylin | 40 | 11 |
| Amitriptylin | 39 | 4 |
| Petidin | 32 | 17 |
| Haloperidol | 44 | 19 |
| Loperamid | 50 | 44 |

Prøvevolum: 150 µl (vann); ekstraksjonstid: 10 min; analyttkonsentrasjon: 1 µg/ml; IS-konsentrasjon: 1 µg/ml; NaOH-konsentrasjon: 40 mM

Amitriptylin-d₆ fungerte godt som internstandard for amitriptylin. For denne analytten var RSD for topparealene på 4 % etter korrigering med internstandard. For nortriptylin, petidin og haloperidol var RSD for arealene under 20 % etter korrigering med internstandard. Variasjonen i toppareal for loperamid (RSD = 44 %) og metadon (RSD = 27%) var høy også etter korrigering med internstandard.

I figur 21 vises de ekstraherte ionekronogrammene for de seks modellanalyttene og internstandarden. Kronogrammet viser at signalet til internstandarden i stor grad følger

samme mønster som signalet til modellanalyttene, særlig gjelder dette for amitriptylin og nortriptylin.



Figur 21: EIC av modellanalyttene og internstandard.

Prøvevolum: 150 µl (vann); ekstraksjonstid: 10 min; analyttkonsentrasjon: 1 µg/ml; IS-konsentrasjon 1 µg/ml; NaOH-konsentrasjon: 40 mM

6.6 Deteksjonsgrenser

Deteksjonsgrensene for analyttene amitriptylin, nortriptylin, metadon og petidin ble bestemt i urin. Morgenurin fra tre friske personer ble kombinert og benyttet som matriks. Det ble laget en fortynningsrekke for de fire legemidlene med konsentrasjon 500 ng/ml, 100 ng/ml, 50 ng/ml, 25 ng/ml og 10 ng/ml. En blank prøve ble også analysert. For hver konsentrasjon ble det ekstrahert fire prøver som deretter ble analysert med DESI-MS. Internstandarden amitriptylin- d_6 ble benyttet til å korrigere signalintensitetene med. Internstandarden ble tilsatt til konsentrasjon 100 ng/ml til hver prøve.

Deteksjonsgrensen ble satt til den konsentrasjonen der forholdet mellom signal og støy var fem ($S/N=5$). Deteksjonsgrensene som ble fastsatt for analyttene er vist i tabell 8.

Tabell 8: Deteksjonsgrenser for metadon, petidin, amitriptylin og nortriptylin (ng/ml).

| Analytt | Deteksjonsgrensen (ng/ml) |
|---------------------|------------------------------|
| Metadon | 4 |
| Petidin | 17 |
| Amitriptylin | 17 |
| Nortriptylin | 17 |

*Prøvevolum: 150 µl (urin); ekstraksjonstid: 10 min;
IS-konsentrasjon: 100 ng/ml; NaOH-konsentrasjon: 80 mM*

For alle analyttene var deteksjonsgrensene lavere enn rapporterte konsentrasjoner i autentiske urinprøver [46, 47]. Dette tydet på at de fastsatte deteksjonsgrensene var realistiske med tanke på å detektere disse analyttene fra autentiske urinprøver. Deteksjonsgrensene ble bestemt med fullscan-modus. Med MS/MS-modus vil det forventes lavere deteksjonsgrense for de fire analyttene.

20 prøver med ulike konsentrasjoner av de fire analyttene ble også ekstrahert og analysert. Morgenurin fra tre friske frivillige ble benyttet som matriks og analyttene ble tilsatt i konsentrasjonsområdet 0-500 ng/ml. Amitriptylin- d_6 fungerte som internstandard og ble tilsatt til konsentrasjon 100 ng/ml. Disse prøvene ble benyttet til å justere deteksjonsgrensene med, og for å undersøke om fastsatt deteksjonsgrense var pålitelig. For hver prøve ble det utført fire paralleller.

Alle fire parallellene måtte gi signal over deteksjonsgrensen ($S/N=5$) for å bli regnet som positivt signal. Likeledes måtte alle fire parallellene gi signal under deteksjonsgrensen for å bli regnet som et negativt signal. Resultatet fra testen er vist i tabell 9 (på neste side).

Tabell 9: De 20 prøvene med tilsatt konsentrasjon (ng/ml), og positiv eller negativ deteksjon i DESI-MS. Positiv deteksjon er merket med +, negativ deteksjon er merket med -.

| | Tilsatt konsentrasjon (ng/ml) | | | | Deteksjon | | | |
|----|-------------------------------|--------------|--------------|---------|-----------|--------------|--------------|---------|
| | Metadon | Nortriptylin | Amitriptylin | Petidin | Metadon | Nortriptylin | Amitriptylin | Petidin |
| 1 | 10 | 20 | 500 | 0 | + | + | + | - |
| 2 | 20 | 0 | 0 | 500 | + | - | - | + |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 30 | - | - | - | + |
| 4 | 40 | 0 | 0 | 100 | + | - | - | + |
| 5 | 10 | 10 | 20 | 30 | + | + | + | + |
| 6 | 10 | 0 | 0 | 0 | + | - | - | - |
| 7 | 0 | 150 | 0 | 0 | - | + | - | - |
| 8 | 5 | 0 | 200 | 0 | + | - | + | - |
| 9 | 100 | 0 | 0 | 0 | + | - | - | - |
| 10 | 400 | 400 | 50 | 30 | + | + | + | + |
| 11 | 0 | 150 | 10 | 10 | - | + | + | - |
| 12 | 0 | 200 | 150 | 0 | - | + | + | - |
| 13 | 50 | 80 | 300 | 500 | + | + | + | + |
| 14 | 50 | 50 | 100 | 0 | + | + | + | - |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - |
| 16 | 0 | 5 | 0 | 0 | - | - | - | - |
| 17 | 0 | 0 | 20 | 0 | - | - | + | - |
| 18 | 0 | 10 | 0 | 0 | - | + | - | - |
| 19 | 0 | 75 | 0 | 200 | - | + | - | + |
| 20 | 25 | 0 | 0 | 25 | + | - | - | + |

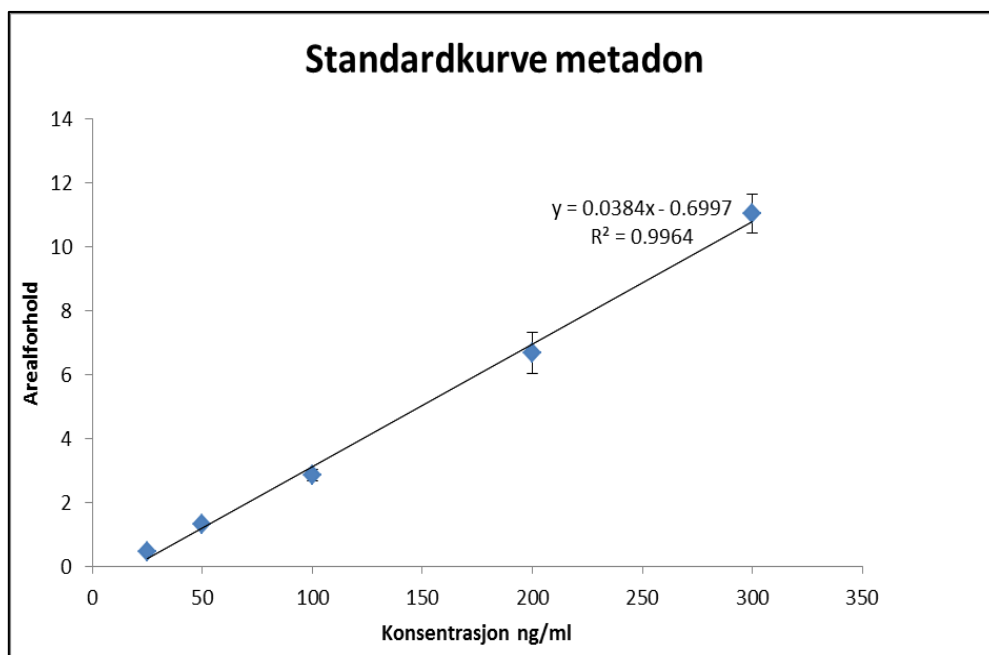
Prøvevolum: 150 µl (urin); ekstraksjonstid: 10 min; analyttkonsentrasjon: 0-500 ng/ml; IS-konsentrasjon: 100 ng/ml; NaOH-konsentrasjon: 80 mM

Testen viste positiv deteksjon i alle prøvene der analytt var tilsatt i konsentrasjon over deteksjonsgrensen. I prøve 5, 11 og 18 ble det detektert analytt selv om tilsatt konsentrasjon var under deteksjonsgrensen. Det ble ikke detektert noen falske positive prøver (det vil si at det ikke ble detektert analytt i prøver der ingen analytt var tilsatt).

6.7 Standardkurver

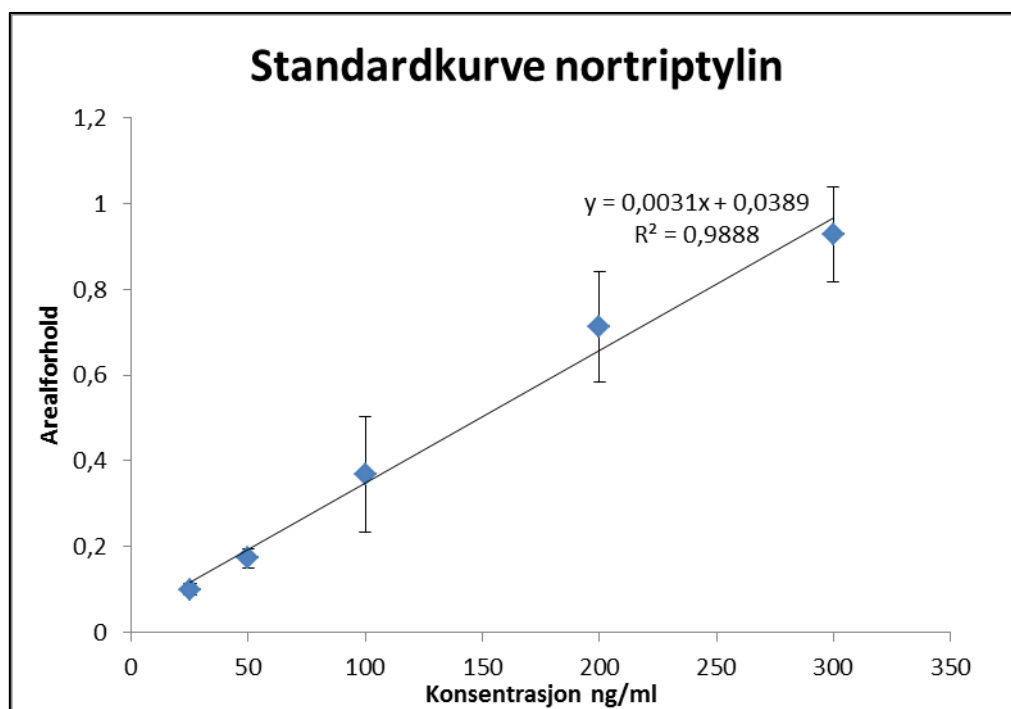
Standardkurver ble laget for modellanalyttene metadon, nortriptylin, amitriptylin og petidin. Disse standardkurvene ble laget med konsentrasjonene 25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml og 300 ng/ml. I tillegg ble det ekstrahert og analysert en blank prøve. Morgenurin fra tre friske personer ble benyttet som matriks. Amitriptylin-d₆ fungerte som internstandard for

alle analyttene og ble tilsatt til konsentrasjon 100 ng/ml i hver prøve. Det ble utført fire paralleller for hver konsentrasjon. Standardkurvene til modellanalyttene er vist i figur 22-25.



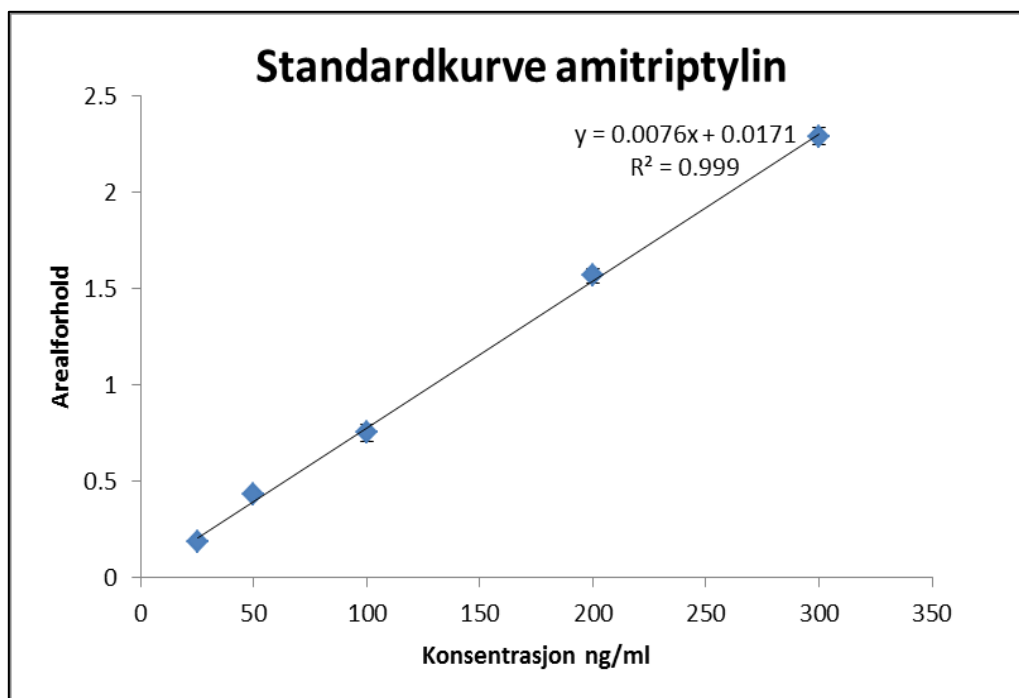
Figur 22: Standardkurve for metadon.

Prøvevolum: 150 μ l (urin); ekstraksjonstid: 10 min; analyttkonsentrasjon: 25-300 ng/ml; IS-konsentrasjon: 100 ng/ml; NaOH-konsentrasjon: 80 mM



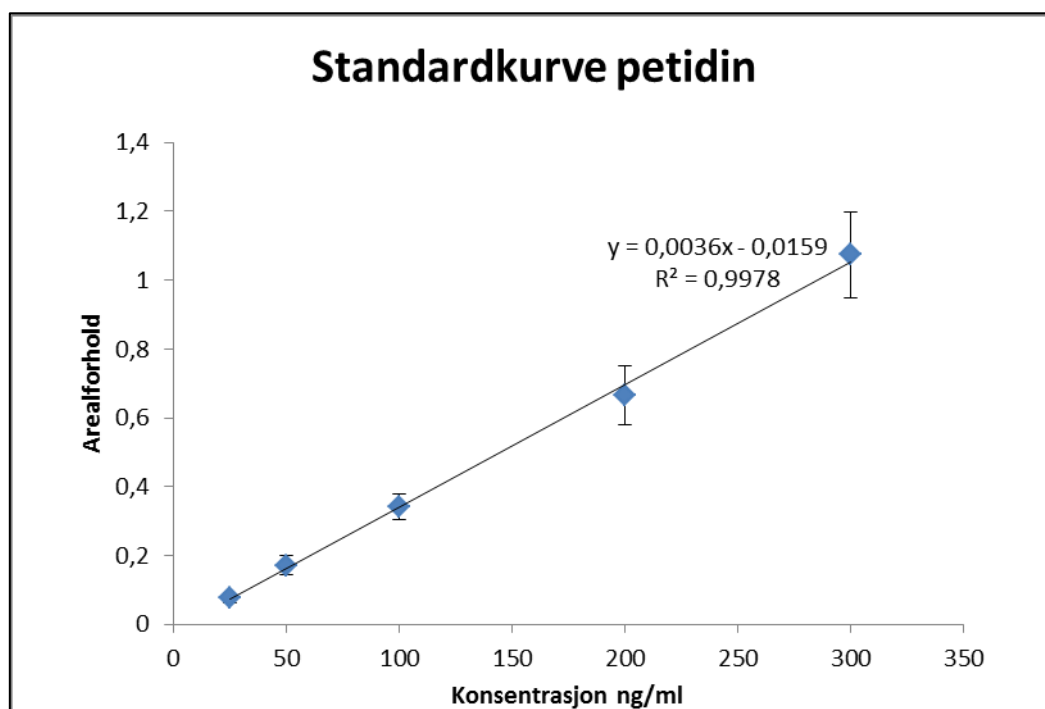
Figur 23: Standardkurve for nortriptylin.

Prøvevolum: 150 μ l (urin); ekstraksjonstid: 10 min; analyttkonsentrasjon: 25-300 ng/ml; IS-konsentrasjon: 100 ng/ml; NaOH-konsentrasjon: 80 mM



Figur 24: Standardkurve for amitriptylin.

Prøvevolum: 150 μ l (urin); ekstraksjonstid: 10 min; analyttkonsentrasjon: 25-300 ng/ml; IS-konsentrasjon: 100 ng/ml; NaOH-konsentrasjon: 80 mM



Figur 25: Standardkurve for petidin.

Prøvevolum: 150 μ l (urin); ekstraksjonstid: 10 min; analyttkonsentrasjon: 25-300 ng/ml; IS-konsentrasjon: 100 ng/ml; NaOH-konsentrasjon: 80 mM

Forholdet mellom konsentrasjon og respons var lineært i konsentrasjonsområdet 25 ng/ml til 300 ng/ml for de fire analyttene. Standardkurvene for metadon ($RSD \leq 11,8\%$), amitriptylin ($RSD \leq 5,0\%$) og petidin ($RSD \leq 17,75\%$) tilfredsstilte FDAs presisjonskrav til kalibreringskurver [48]. Kalibreringskurven for nortriptylin ($RSD \leq 32,3\%$) hadde lavere presisjon enn kalibreringskurvene for de andre analyttene, og tilfredsstilte ikke dette kravet.

6.8 Pålitelighetstester

Analysemetoden ble også undersøkt med en pålitelighetstest for kvantitative målinger. I morgenurin fra en frisk person ble åtte prøver tilsatt ulike konsentrasjoner av metadon, nortriptylin, amitriptylin og petidin i konsentrasjonsområdet 0-300 ng/ml. Internstandarden amitriptylin- d_6 ble tilsatt til konsentrasjon 100 ng/ml i hver prøve. For hver prøve ble fire paralleller ekstrahert og analysert.

Kalibreringskurver for analyttene ble laget i morgenurin fra tre friske personer.

Pålitelighetstesten ble utført samme dag som standardkurvene ble tillaget. Standardkurvene ble derfor benyttet som kalibreringskurver. I prøvene som viste positivt signal for analytten(e) ($S/N=5$) ble konsentrasjonen i prøven beregnet ut fra kalibreringskurvene. Resultatet fra pålitelighetstesten er vist i tabell 10.

Tabell 10: Målt konsentrasjon (ng/ml), tilsatt konsentrasjon (ng/ml) og avvik (%) for metadon, nortriptylin, amitriptylin og petidin i urin.

| Test | <i>Metadon ng/ml</i> | | | <i>Nortriptylin ng/ml</i> | | | <i>Amitriptylin ng/ml</i> | | | <i>Petidin ng/ml</i> | | |
|------|----------------------|----------------|----------------|---------------------------|----------------|----------------|---------------------------|----------------|----------------|----------------------|----------------|----------------|
| | <i>målt</i> | <i>tilsatt</i> | <i>% avvik</i> | <i>målt</i> | <i>tilsatt</i> | <i>% avvik</i> | <i>målt</i> | <i>tilsatt</i> | <i>% avvik</i> | <i>målt</i> | <i>tilsatt</i> | <i>% avvik</i> |
| 1 | 53 | 50 | 6 | 188 | 200 | -6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 133 | 150 | -11 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 111 | 150 | -26 | 61 | 70 | -13 | 187 | 200 | -7 | 67 | 100 | -33 |
| 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 85 | 90 | -6 | 100 | 150 | -33 |
| 5 | 0 | 0 | 0 | 74 | 100 | -26 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 183 | 250 | -27 | 0 | 0 | 0 | 55 | 50 | 10 | 43 | 50 | -14 |
| 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 8 | 67 | 90 | -26 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Prøvevolum: 150 μ l(urin); ekstraksjonstid: 10 min; analyttkonsentrasjon: 0-300 ng/ml; IS-konsentrasjon: 100 ng/ml; NaOH-konsentrasjon: 80 mM

For amitriptylin var avvikene mellom estimert konsentrasjon og tilsatt konsentrasjonen 11 % eller lavere. Dette tilfredsstiller FDAs nøyaktighetskrav til bioanalytiske metoder [48]. For de andre analyttene var avvikene i mange av målingene større (6-33 %). Dette skyldes sannsynligvis at amitriptylin- d_6 ikke fungerte like godt som internstandard for disse stoffene.

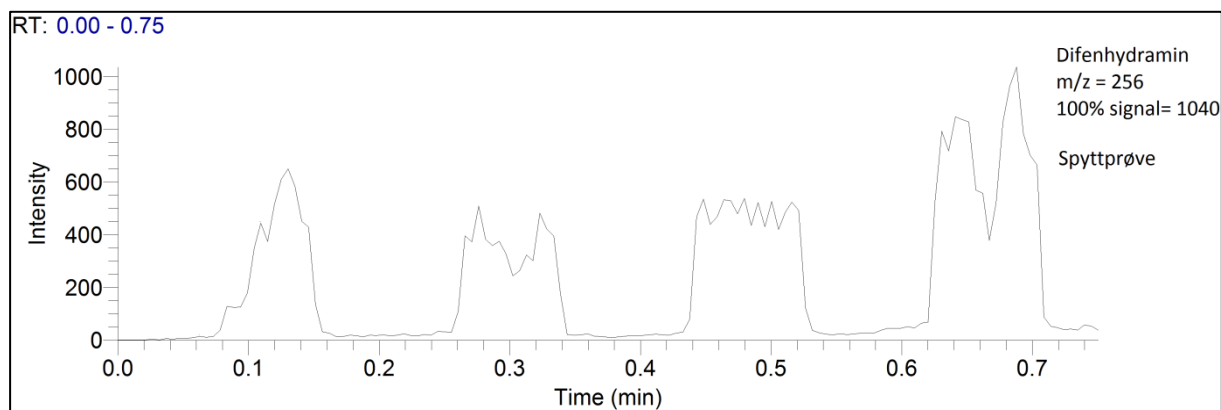
6.9 Autentiske prøver

6.9.1 Deteksjon av difenhydramin i autentiske prøver

I de tidligere eksperimentene ble biologiske matrikser tilsatt modellanalyttene. I dette forsøket ble autentiske biologiske prøver undersøkt. Difenhydramin ble valgt som substans til disse forsøkene. Difenhydramin er et antihistamin som kan kjøpes uten resept. Dette legemiddelet er en base med relativt høy log p-verdi, og har derfor egenskapene til å kunne ekstraheres over til væskefilmene [43]. Difenhydramin har også vist seg å kunne analyseres med DESI-MS [31].

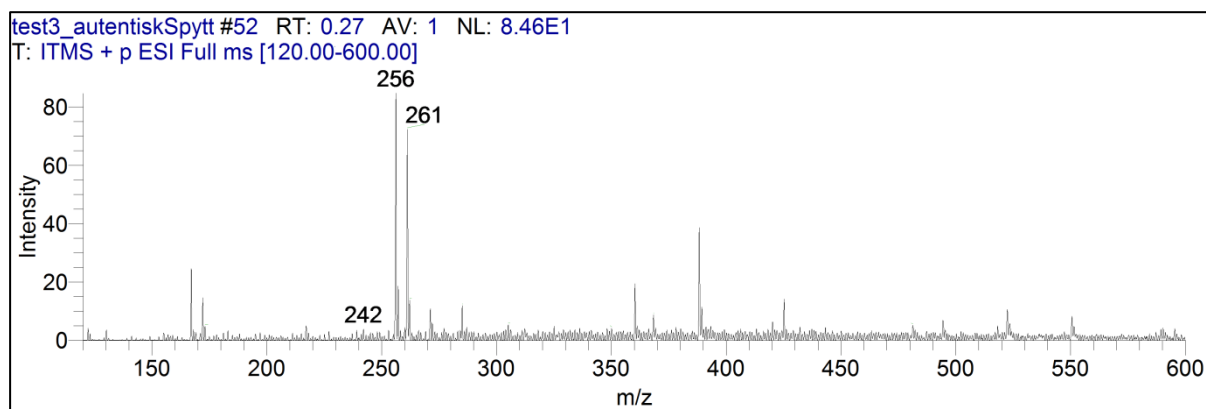
To tabletter *Tylenol PM* ble inntatt av en frisk frivillig person. Urinprøver, spyttprøver og blodprøver ble tatt fra forsøkspersonen to timer etter inntak av legemiddelet. Prøvene ble deretter ekstrahert før analyse med DESI-MS. Difenhydramin- d_5 ble benyttet som internstandard og tilsatt til konsentrasjon 100 ng/ml til hver prøve. Det ble utført fire paralleller for hver matriks. I disse forsøkene ble matriksene kun undersøkt for innhold av difenhydramin. *Tylenol PM* inneholdt også paracetamol. Denne substansen har ikke egenskapene til å kunne ekstraheres over i væskefilmene fordi paracetamol er en syre med lav log p-verdi (log p-verdi 0,5) [43].

Etter ekstraksjon av urin- og spyttprøver kunne difenhydramin detekteres med DESI-MS i fullscan-modus. Difenhydramin ble detektert med høy signalintensitet fra begge prøvene. Den aktive metabolitten nordifenhydramin kunne også observeres ved m/z-verdi 242 i både spytt- og urinprøven [49]. Figur 26 viser det ekstraherte ionekronogrammet fra ekstraksjon av den autentiske spyttprøven. I figur 27 og 28 vises massespekteret fra analyse av henholdsvis autentisk spyttprøve og autentisk urinprøve.



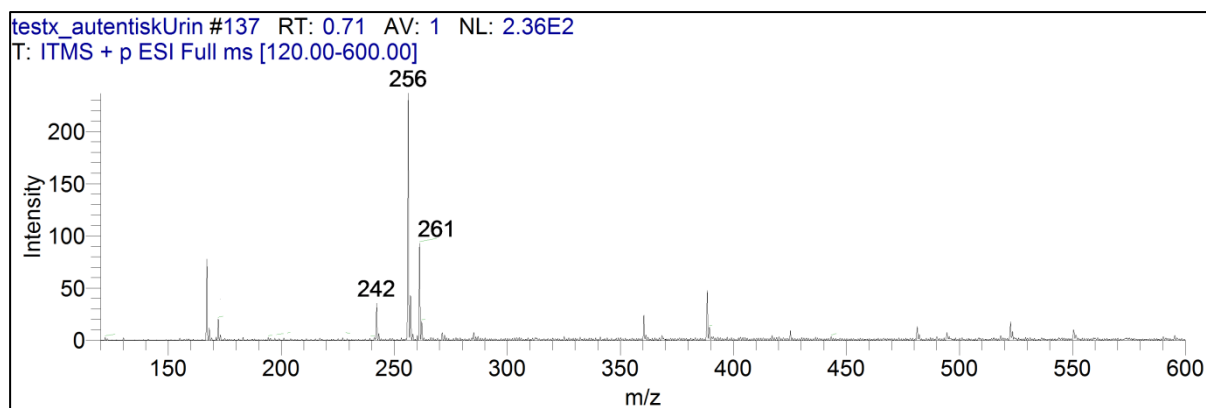
Figur 26: EIC av difenhydramin fra autentisk spyttprøve.

Prøvevolum: 150 μ l (autentisk spyttprøve); ekstraksjonstid: 10 min; analyttkonsentrasjon: ukjent; IS-konsentrasjon: 100 ng/ml; NaOH-konsentrasjon: 80 mM



Figur 27: Massespekteret fra autentisk spyttprøve viser difenhydramin m/z 256, nordifenhydramin m/z 242 og tilsatt internstandard m/z 261.

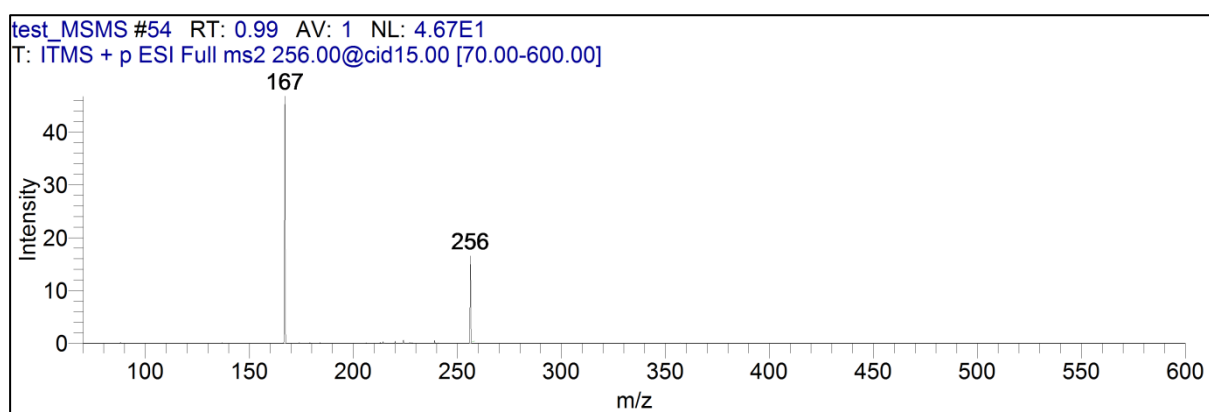
Prøvevolum: 150 μ l (autentisk spyttprøve); ekstraksjonstid: 10 min; analyttkonsentrasjon: ukjent; IS-konsentrasjon: 100 ng/ml; NaOH-konsentrasjon: 80 mM



Figur 28: Massespekteret fra autentisk urinprøve viser difenhydramin m/z 256, nordifenhydramin m/z 242 og tilsatt internstandard m/z 261.

Prøvevolum: 150 μ l (autentisk urinprøve); ekstraksjonstid: 10 min; analyttkonsentrasjon: ukjent; IS-konsentrasjon: 100 ng/ml; NaOH-konsentrasjon: 80 mM

Analyse etter ekstraksjon av helblod ga derimot svak signalintensitet for analytten og for internstandard. Analyttens tilstedeværelse i blod ble bekreftet med MS/MS-modus, men signalintensitetene var også lave ved analyse i denne modusen. Difenhydramin er rundt 85-90 % proteinbundet [50]. Dette kan være en mulig forklaring på dårlig signalintensitet fra difenhydramin i helblod. I tillegg er helblod, som tidligere nevnt, en viskøs matriks som kan nedsette analyttens diffusjonshastighet. Det ble også observert blodkoaguleringer på overflaten av væskefilmene etter ekstraksjonen. Koagulering kan føre til redusert utbytte av analytten. Figur 29 viser MS/MS-spekteret fra analyse av helblod.

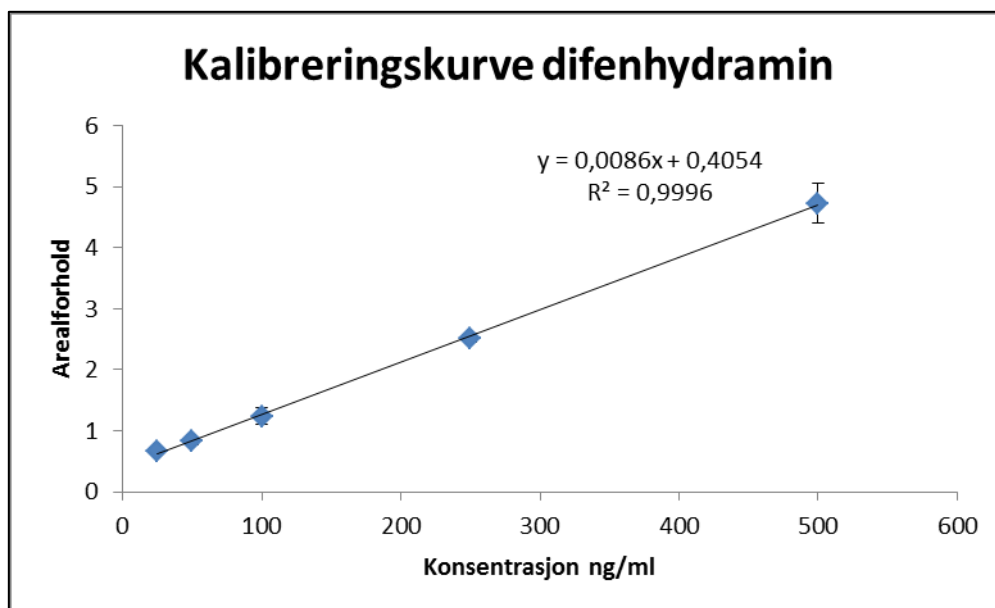


Figur 29: MS/MS-spekteret fra autentisk helblod viser produktionet m/z 167 og difenhydramin ved m/z 256.

Prøvevolum: 150 µl (autentisk blodprøve); ekstraksjonstid: 10 min; analyttkonsentrasjon: ukjent; IS-konsentrasjon: 100 ng/ml; NaOH-konsentrasjon: 80 mM

6.9.2 Konsentrasjon difenhydramin i autentisk urinprøve

Konsentrasjon difenhydramin i den autentiske urinprøven ble estimert ved hjelp av en kalibreringskurve for legemiddelet. I morgenurin fra tre friske personer ble det tilsatt difenhydramin til konsentrasjon 25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 250 ng/ml og 500 ng/ml. Difenhydramin-d₅ ble benyttet som internstandard og tilsatt til konsentrasjon 100 ng/ml i hver prøve. For hver konsentrasjon ble det utført fire prøveparalleller. Figur 30 viser kalibreringskurven til difenhydramin i urin.



Figur 30: Kalibreringskurve for difenhydramin.

*Prøvevolum: 150 µl (urin); ekstraksjonstid: 10 min; analyttkonsentrasjon: 25-500 ng/ml;
IS-konsentrasjon: 100 ng/ml; NaOH-konsentrasjon: 80 mM*

Forholdet mellom respons og konsentrasjon var lineær i området 25 ng/ml til 500 ng/ml ($RSD < 5,18\%$), og tilfredsstilte FDAs presisjonskrav til kalibreringskurver [48].

Kalibreringskurven ble benyttet til å estimere konsentrasjonen av difenhydramin i den autentiske urinprøven. Ekstraksjonen av den autentiske urinprøven ble utført på samme måte som for prøvene i kalibreringskurven. Det ble utført fire paralleller og gjennomsnittlig toppareal fra disse ble benyttet for å bestemme konsentrasjonen. Konsentrasjon av difenhydramin i den autentiske urinprøven ble estimert til 293 ng/ml.

7. Konklusjon

Væskefilm-mikroekstraksjon, med direkte DESI-MS på disse, har for første gang blitt demonstrert. Ekstraksjonstid på 10 minutter og analysetid på under 1 minutt gjør dette til en hurtig analysemetode. Metoden er derfor et lovende verktøy for deteksjon av misbruksstoffer i biologiske prøver, der raske analysesvar ofte er ønsket.

Volumforholdet mellom prøven og væskefilmene ga oppkonsentrering av analyttene. Høy oppkonsentrering førte til deteksjonsgrenser i nanogram-området i fullscan-modus. I en test med 20 prøver ble det også fastslått at deteksjonsgrensene var pålitelige. Metoden er avhengig av en internstandard for å kunne benyttes til kvantitative målinger. Valg av internstandard var likevel ikke kritisk for å oppnå lineære standardkurver med god presisjon.

Den hydrofobe væskefilmen ga mulighet for god prøveopprensning og metoden ble videre vist å være kompatibel med biologiske prøver. Ved å analysere *undersiden* av væskefilmene ble det også demonstrert at ioneundertrykking fra matriksen ble redusert, sammenliknet med analyse av *oversiden*. Deteksjon av legemiddel og metabolitten fra autentiske spytt-, blod- og urinprøver var også med på å bekrefte metodens bioanalytiske anvendelse.

Dimensjonene på ekstraksjonsutstyret kan videre justeres for å tilpasses mengde prøvevolum, mengde væskefilm og antall prøver som kan ekstraheres samtidig. Konseptet kan for eksempel enkelt oppskaleres til 96-brønnsformat. Metoden har derfor potensial for en høy prøvegjennomstrømming.

Metodens begrensninger er først og fremst knyttet til ekstraksjon av mindre lipofile legemidler da den organiske væskefilmen er av veldig lipofil karakter. Andre væskefilmer, bruk av en hydrofob bærer eller elektromembranekstraksjon, bør undersøkes for å finne en løsning på dette problemet. Likeledes vil også elektromembranekstraksjon kunne øke ekstraksjonshastigheten, slik at ekstraksjonen trolig kan utføres raskere og med høyere utbytte.

8. Litteraturliste

1. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Bioanalyse av legemidler*, in *Legemiddelanalyse*. 2004, Fagbokforlaget: Bergen. p. 449.
2. Pedersen-Bjergaard, S. and K. Rasmussen, *Introduksjon til prøveopparbeidelse*, in *Legemiddelanalyse*. 2004: Bergen. p. 272-274.
3. Pedersen-Bjergaard, S. and K. Rasmussen, *Væske-væske-ekstraksjon (LLE)*, in *Legemiddelanalyse*. 2004, Fagbokforlaget: Bergen.
4. Pedersen-Bjergaard, S. and K. Rasmussen, *Fast-fase-ekstraksjon (SPE)*, in *Legemiddelanalyse*. 2004, Fagbokforlaget: Bergen. p. 287.
5. James, C.A., *Sample preparation*, in *Principles and practice of bioanalysis*, R.F. Venn, Editor. 2008, CRC Press Taylor & Francis group: Boca Raton. p. 37.
6. Liu, H. and P.K. Dasgupta, *Analytical chemistry in a drop. Solvent extraction in a microdrop*. analytical Chemistry, 1996. **68**: p. 1871-1821.
7. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis*. Anal Chem, 1999. **71**(14): p. 2650-6.
8. Pedersen-Bjergaard, S., et al., *Liquid-phase microextraction of basic drugs--selection of extraction mode based on computer calculated solubility data*. J Sep Sci, 2005. **28**(11): p. 1195-203.
9. Ho, T.S., S. Pedersen-Bjergaard, and K.E. Rasmussen, *Experiences with carrier-mediated transport in liquid-phase microextraction*. J Chromatogr Sci, 2006. **44**(6): p. 308-16.
10. Ho, T.S., S. Pedersen-Bjergaard, and K.E. Rasmussen, *Liquid-phase microextraction of protein-bound drugs under non-equilibrium conditions*. Analyst, 2002. **127**(5): p. 608-13.
11. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Liquid-phase microextraction and capillary electrophoresis of acidic drugs*. Electrophoresis, 2000. **21**(3): p. 579-85.
12. Bjørhovde, A., et al., *Liquid-phase microextraction of drugs from human breast milk*. Analytica Chimica Acta, 2003. **491**(2): p. 155-161.
13. Gronhaug Halvorsen, T., S. Pedersen-Bjergaard, and K.E. Rasmussen, *Reduction of extraction times in liquid-phase microextraction*. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 2001. **760**(2): p. 219-26.
14. Rasmussen, K.E., et al., *Development of a simple in-vial liquid-phase microextraction device for drug analysis compatible with capillary gas chromatography, capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography*. J Chromatogr A, 2000. **873**(1): p. 3-11.
15. de Jager, L. and A.R.J. Andrews, *Development of a screening method for cocaine and cocaine metabolites in saliva using hollow fiber membrane solvent microextraction*. Analytica Chimica Acta, 2002. **458**(2): p. 311-320.
16. Rasmussen, K.E. and S. Pedersen-Bjergaard, *Development in hollow fibre-based liquid-phase mixroextraction*. Trends in analytical chemistry, 2004. **23**: p. 1-10.
17. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Electrokinetic migration across artificial liquid membranes. New concept for rapid sample preparation of biological fluids*. J Chromatogr A, 2006. **1109**(2): p. 183-90.
18. Gjelstad, A., et al., *Microextraction across supported liquid membranes forced by pH gradients and electrical fields*. J Chromatogr A, 2007. **1157**(1-2): p. 38-45.
19. Hoffmann, E. and V. Stroobant, *Mass Spectrometry Principles and Application*. 3 ed. 2007, England: Wiley.

20. Doig, M.V. and D.M. Higton, *Fundamental Aspects of Mass Spectrometry*, in *Principles and practice of bioanalysis*, R.F. Venn, Editor. 2008, CRC press Taylor & Francis group: Boca Raton. p. 203.
21. Takats, Z., et al., *Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization*. Science, 2004. **306**(5695): p. 471-3.
22. Huang, G., et al., *Rapid screening of anabolic steroids in urine by reactive desorption electrospray ionization*. Anal Chem, 2007. **79**(21): p. 8327-32.
23. Cotte-Rodriguez, I., et al., *Desorption electrospray ionization of explosives on surfaces: sensitivity and selectivity enhancement by reactive desorption electrospray ionization*. Anal Chem, 2005. **77**(21): p. 6755-64.
24. Takats, Z., J.M. Wiseman, and R.G. Cooks, *Ambient mass spectrometry using desorption electrospray ionization (DESI): instrumentation, mechanisms and applications in forensics, chemistry, and biology*. J Mass Spectrom, 2005. **40**(10): p. 1261-75.
25. Higton, D.M. and M.V. Doig, *Quantitative LC-MS*, in *Principles and practice of bioanalysis*, R.F. Venn, Editor. 2008, CRC Press Taylor & Francis group: Boca Raton. p. 231-232.
26. Suni, N.M., et al., *Matrix effect in the analysis of drugs of abuse from urine with desorption atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry (DAPPI-MS) and desorption electrospray ionization-mass spectrometry (DESI-MS)*. Anal Chim Acta, 2011. **699**(1): p. 73-80.
27. Mulligan, C.C., et al., *Fast analysis of high-energy compounds and agricultural chemicals in water with desorption electrospray ionization mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2007. **21**(22): p. 3729-36.
28. D'agostino, P., et al., *Desorption electrospray ionisation mass spectrometric analysis of chemical warfare agents from solid-phase microextraction fibers*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2007. **21**: p. 543-549.
29. Kennedy, J.H., et al., *Coupling desorption electrospray ionization with solid-phase microextraction for screening and quantitative analysis of drugs in urine*. Anal Chem, 2010. **82**(17): p. 7502-8.
30. Strittmatter, N., R.A. Doring, and Z. Takats, *Analysis of wastewater samples by direct combination of thin-film microextraction and desorption electrospray ionization mass spectrometry*. Analyst, 2012. **137**(17): p. 4037-44.
31. Thunig, J., et al., *Liquid-phase microextraction and desorption electrospray ionization mass spectrometry for identification and quantification of basic drugs in human urine*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2012. **26**(2): p. 133-40.
32. Bardstü, K.F., et al., *Supported liquid membranes in hollow fiber liquid-phase microextraction (LPME)-practical considerations in the three-phase mode*. J Sep Sci, 2007. **30**(9): p. 1364-70.
33. Ho, T.S., S. Pedersen-Bjergaard, and K.E. Rasmussen, *Recovery, enrichment and selectivity in liquid-phase microextraction comparison with conventional liquid-liquid extraction*. J Chromatogr A, 2002. **963**(1-2): p. 3-17.
34. Ho, T.S., et al., *25,000-fold pre-concentration in a single step with liquid-phase microextraction*. Anal Chim Acta, 2007. **592**(1): p. 1-8.
35. Cooks, R.G., et al., *Ambient Mass Spectrometry*. Science, 2006. **311**: p. 1566-1570.
36. Gross, J.H., *Ambient mass spectrometry*, in *Mass spectrometry*. 2011, Springer: Heidelberg. p. 622-631.
37. Costa, A.B. and R. Graham Cooks, *Simulated splashes: Elucidating the mechanism of desorption electrospray ionization mass spectrometry*. Chemical Physics Letters, 2008. **464**(1-3): p. 1-8.

38. Venter, A., N. Marcela, and R.G. Cooks, *Ambient desorption ionization mass spectrometry*. Trends in analytical chemistry, 2008. **27**(4): p. 284-290.
39. Ifa, D.R., et al., *Quantitative analysis of small molecules by desorption electrospray ionization mass spectrometry from polytetrafluoroethylene surfaces*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2008. **22**(4): p. 503-10.
40. Kauppila, T.J., et al., *Desorption electrospray ionization mass spectrometry for the analysis of pharmaceuticals and metabolites*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2006. **20**(3): p. 387-92.
41. Kauppila, T.J., et al., *Rapid analysis of metabolites and drugs of abuse from urine samples by desorption electrospray ionization-mass spectrometry*. Analyst, 2007. **132**(9): p. 868-75.
42. Annesley, T.M., *Ion suppression in mass spectrometry*. Clin Chem, 2003. **49**(7): p. 1041-4.
43. Poisons, C.s.A.o.D.a. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. etbl. 1969 [cited 15.02 2013]; Available from:
<http://www.medicinescomplete.com/mc/clarke/current/d1e4.htm>.
44. Ho, T.S., et al., *Liquid-phase microextraction of hydrophilic drugs by carrier-mediated transport*. J Chromatogr A, 2003. **998**(1-2): p. 61-72.
45. laboratorium, F.M. *S-metadon*. etbl. 1950 [cited 2013 21.02]; Available from:
<http://www.furst.no/analyse-og-klinikk/analyser/metadon/>.
46. Myung, S.W., et al., *Solid-phase microextraction for the determination of pethidine and methadone in human urine using gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection*. Analyst, 1999. **124**(9): p. 1283-6.
47. Rana, S., V.P. Uralets, and W. Ross, *A new method for simultaneous determination of cyclic antidepressants and their metabolites in urine using enzymatic hydrolysis and fast GC-MS*. J Anal Toxicol, 2008. **32**(5): p. 355-63.
48. Shah, et al. *FDA Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation*. 2001; Available from:
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf>.
49. Baldacci, A., F. Prost, and W. Thormann, *Identification of diphenhydramine metabolites in human urine by capillary electrophoresis-ion trap-mass spectrometry*. Electrophoresis, 2004. **25**(10-11): p. 1607-14.
50. Fass. *Desentol*. etbl. 1966 [cited 2013 20.03]; Available from:
http://www.fass.se/LIF/produktfakta/artikel_produkt.jsp?NplID=19511024000016&DocTypeID=3.

Vedlegg

| Analytt/spray | MeOH | MeOH | MeOH 1% HCOOH | MeOH 1% NH3 | ACN | ACN 1% HCOOH | ACN 1% NH3 | Aceton | Aceton 1% HCOOH | Aceton 1% NH3 |
|---------------|-------|------|---------------|-------------|------|--------------|------------|--------|-----------------|---------------|
| Metadon | 12900 | | 12900 | 11400 | 5430 | 11200 | 12100 | 2870 | 12500 | 14700 |
| Loperamid | 5300 | | 5300 | 5300 | 884 | 5300 | 5300 | 982 | 5300 | 5290 |
| Amitriptylin | 3350 | | 4030 | 2150 | 173 | 1570 | 2880 | 130 | 1560 | 886 |
| Petidin | 2010 | | 2760 | 1150 | 145 | 998 | 1250 | 87 | 856 | 453 |
| Haloperidol | 1430 | | 3670 | 2420 | 46 | 1590 | 935 | 89 | 597 | 924 |
| Nortriptylin | 113 | | 2050 | 1330 | 69 | 1210 | 593 | 39 | 661 | 325 |

Vedlegg 1: Signalintensitet for modellanalyttene med ulike sprayløsemidler